(11) Número de Publicação: **PT 2436696 T**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/18 (2017.01) ***A61K 39/395*** (2017.01)
A61P 25/28 (2017.01)

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

(22) Data de pedido: **2008.01.07**

(30) Prioridade(s): **2007.01.05 EP 07000211**
2007.01.05 US 878831 P
2007.06.11 US 934291 P
2007.10.17 EP 07020341

(43) Data de publicação do pedido: **2012.04.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.06.07**
161/2017

(73) Titular(es):
UNIVERSITY OF ZURICH
RÄMISTR. 71 8006 ZURICH **CH**

(72) Inventor(es):
ROGER, PROF. NITSCH, DR. **CH**
CHRISTOPH, HOCK, PROF. **CH**
CHRISTOPH ESSLINGER, DR. **CH**
MARLEN KNOBLOCH **CH**
KATHRIN TISSOT **DE**

(74) Mandatário:
MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA
RUA DOS BACALHOEIROS, 4 1100-070 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPO ANTI-BETA-AMILOIDE E USOS DO MESMO**

(57) Resumo:
SÃO FORNECIDAS NOVAS MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS, PARTICULARMENTE ANTICORPOS HUMANOS, BEM COMO FRAGMENTOS, DERIVADOS E SUAS VARIANTES QUE RECONHECEM OS NECEPITOPOS DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À DOENÇA QUE DERIVAM DE PROTEÍNAS ENDÓGENAS NATIVAS, MAS SÃO PREVALENTES NO CORPO DE UM PACIENTE EM UMA FORMA VARIANTE E/ OU FORA DO SEU CONTEXTO FISIOLÓGICO NORMAL. ALÉM DISSO, SÃO DESCRITAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO TAIS MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO, ANTICORPOS E IMITADORES DOS MESMOS E MÉTODOS DE RASTREIO PARA NOVAS MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO, QUE PODEM OU NÃO SER ANTICORPOS, BEM COMO ALVOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS TAIS COMO A DOENÇA DE ALZHEIMER.

RESUMO

ANTICORPO ANTI-BETA-AMILOIDE E USOS DO MESMO

São fornecidas novas moléculas de ligação específicas, particularmente anticorpos humanos, bem como fragmentos, derivados e suas variantes que reconhecem os neoepitopos de proteínas associadas à doença que derivam de proteínas endógenas nativas, mas são prevalentes no corpo de um paciente em uma forma variante e / ou fora do seu contexto fisiológico normal. Além disso, são descritas composições farmacêuticas compreendendo tais moléculas de ligação, anticorpos e imitadores dos mesmos e métodos de rastreio para novas moléculas de ligação, que podem ou não ser anticorpos, bem como alvos no tratamento de doenças neurológicas tais como a doença de Alzheimer.

DESCRIÇÃO

ANTICORPO ANTI-BETA-AMILOIDE E USOS DO MESMO

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção refere-se a novas moléculas de ligação específicas, particularmente anticorpos humanos tal como fragmentos, derivados e variantes destes que reconhecem epítopos associados a doenças, DESincluindo neo-epítopos, de proteínas que derivam de proteínas endógenas nativas, e que são prevalentes no corpo de um paciente numa forma variante e/ou fora do seu contexto fisiológico normal. Adicionalmente, a presente invenção refere-se a composições farmacêuticas contendo estas moléculas de ligação, anticorpos e mimetizadores destes no tratamento da doença de Alzheimer, amiloidoses e a patologia beta-amiloide.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] O sucesso na criação de anticorpos monoclonais depende da eficiência e da fusão seletiva de células B estimuladas com antigénio com uma linha celular de mieloma murino seguida da seleção de híbridos estáveis produtores de anticorpos tal como originalmente descrito por Köhler e Milstein, Nature 256 (1975), 495-497. No entanto, a utilidade terapêutica de anticorpos murinos em humanos é afetada pela resposta do anticorpo humano anti-murganho *(human anti-mouse antibody (HAMA))*, devido à sua origem não humana. Através de engenharia genética tornaram-se possíveis métodos de criação de anticorpos monoclonais humanos ou semelhantes a humanos. No entanto, os métodos disponíveis até ao momento sofrem com a desvantagem de não serem adequados à produção de anticorpos com as características daqueles que são produzidos no decurso de uma resposta imunitária fisiológica humana. Além disto, estes anticorpos podem não ser suficientemente específicos, devido à existência de reatividade cruzada com outras

proteínas e/ou a proteína alvo no contexto do seu funcionamente fisiológico normal. Nos casos das doenças de Alzheimer e Parkinson, por exemplo, considera-se que os anticorpos que também reagem com uma elevada afinidade com derivados fisiológicos da proteína precursora amiloide *(amyloid precursor protein (APP))*, ou a alfa-sinucleína *(alpha synuclein)*, são responsáveis por efeitos secundários relacionados com as funções normais das estruturas fisiológicas alvo. A este respeito, seria diretamente induzida uma doença autoimune indesejada - um risco dificilmente calculável no desenho conceptual de experiências de imunização ativa utilizando estruturas proteicas que, na sua forma alternativa, também ocorrem fisiologicamente. Efeitos secundários não relacionados com a estrutura alvo são, por exemplo, as reações anafiláticas, tal como seriam de esperar enquanto efeitos secundários indesejados e temidos da administração sistémica de proteínas exógenas. De acordo com descobertas recentes, este pode também ser o caso para os designados anticorpos humanizados, originalmente derivados de organismos não humanos, normalmente de murganhos. Por outro lado, a imunização ativa com antigénios patológicos relevantes possui o risco considerável de os pacientes produzirem anticorpos e desenvolverem respostas de células T que também reconheçam variantes fisiológicas destas proteínas levando a, como consequência, uma resposta autoimune perigosa e incontrolável. Encontram-se descritos no estado da arte anticorpos que reconhecem um epítopo de beta-amiloide presente em cérebros doentes mas não em secções de controlos saudáveis e que não reconhecem a proteína precursora amiloide (Geylis *et al.* Neurobiology of Aging, vol.26, no. 5, Maio 2005, páginas 597-606).

[0003] Assim, existe a necessidade de fornecer agentes que sejam específicos para um alvo envolvido numa doença e que sejam tolerados pelo corpo humano.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0004] O problema técnico subjacente da presente invenção foi resolvido pelas formas de realização práticas caraterizadas nas reivindicações.

[0005] A presente invenção faz uso da descoberta surpreendente de que os anticorpos também podem ser direcionados contra variantes patofisiologicamente relevantes de proteínas endógenas, particularmente contra neo-epítopos, que são formados devido a uma transcrição, tradução, ou modificação pós-trancripção ou pós-tradução, ou processamento proteolítico, ou agregação patologicamente alteradas. Estes anticorpos são direcionados contra proteínas endógenas que, devido à sua nova estrutura que difere da fisiologia normal, se tornam patofisiologicamente relevantes por meio do desenvolvimento de efeitos patológicos. Por razões de tolerância imunológica, os anticorpos associados com a resposta imunológica correspondente a neo-epítopos em tais variantes patológicas não exibem normalmente quaisquer reações cruzadas contra as proteínas fisiologicamente funcionais, no entanto, em contraste com o caso das doenças autoimunes. Isto ocorre porque a formação de anticorpos com potencial para reações cruzadas é especificamente suprimida pelos mecanismos de tolerância conhecidos, enquanto que o desenvolvimento de uma resposta imunológica a um neo-epítopo patológico pode escapar a estes mecanismos de tolerância.

[0006] A presente invenção é dirigida a anticorpos humanos, e fragmentos de ligação a antigénio destes, compreendendo uma região variável de cadeia pesada *(heavy chain variable region (VH))* com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:39, e uma região variável de cadeia leve *(light chain variable region (VL))* com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:41. Alternativamente, o anticorpo é um anticorpo humanizado, xenogénico, ou um anticorpo quimérico humano-murganho, sendo o último particularmente útil para métodos de diagnóstico e estudos em animais. Composições terapêuticas incluindo o anticorpo, ou fragmentos ativos deste, ou agonistas e moléculas cognatas, ou alternativamente, antagonistas do mesmo, e métodos de utilização de tais composições na prevenção, diagnóstico ou tratamento de uma doença utilizando estas composições são também incluídas, em que uma quantidade eficaz da composição é administrada a um paciente que necessite deste tratamento.

[0007] O fragmento de ligação a antigénio do anticorpo pode ser um fragmento de cadeia simples Fv, um fragmento F(ab'), um fragmento F(ab), e um fragmento $F(ab)'_2$, ou qualquer outro fragmento de ligação a antigénio. Numa forma específica de realização prática da presente invenção, *infra*, o anticorpo, ou fragmento deste, é um anticorpo humano de isotipo IgG.

[0008] A presente invenção também se refere a polinucleótidos codificantes para pelo menos uma região variável de uma cadeia de imunoglobulina do anticorpo da invenção. A referida região variável compreende as regiões determinantes de complementaridade *(complementarity determining regions (CDRs))* tal como apresentadas na Tabela 4.

[0009] Consequentemente, a presente invenção também abrange vetores, contendo os referidos polinucleótidos, e células hospedeiras transformadas com os mesmos, tal como a sua

utilização para a produção de um anticorpo, e moléculas de ligação equivalentes, específicas para neo-epítopos que sejam indicativos e/ou causativos da doença de Alzheimer.

[0010] O anticorpo, cadeia(s) de imunoglobulina, fragmentos de ligação deste e a ligação do antigénio ao referido anticorpo podem ser utilizados em composições farmacêuticas para imunoterapia e diagnóstico, respetivamente. É contudo preferível a utilização das composições anteriores na preparação de um medicamento.

[0011] Assim, é um objetivo particular da presente invenção fornecer composições farmacêuticas para utilização no tratamento, prevenção ou retardamento do aparecimento de doenças associadas com a acumulação e deposição do péptido da beta-amiloide num sujeito, tal como na doença de Alzheimer, síndrome de Down, enfraquecimento cognitivo suave, angiopatia amiloide cerebral, demência vascular e demência de multi-infarto. O tratamento compreende a administração de uma concentração eficaz de um anticorpo, ou derivado do anticorpo, ao sujeito, em que o anticorpo se liga à forma patológica da proteína, ou depósito de proteína, com uma afinidade maior do que para a forma fisiológica normal da proteína.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0012]

Fig. 1: Anticorpo contra a beta-amiloide. **A:** Anticorpos humanos. **B:** Marcação controlo com um anticorpo conhecido contra beta-amiloide humana. Pacientes invulgarmente estáveis clinicamente com doença de Alzheimer contém anticorpos contra placas de beta-amiloide. Marcação

imunohistoquímica com anticorpos de pacientes invulgarmente estáveis clinicamente em secções cerebrais obtidas a partir de pacientes com doença de Alzheimer patologicamente confirmada revela anticorpos que se ligam às placas de beta-amiloide, confirmado por um anticorpo conhecido contra a beta-amiloide humana.

Fig. 2: Anticorpo contra emaranhados neurofibrilares. **A:** Anticorpos humanos. **B:** Marcação controlo com um anticorpo conhecido contra a tau humana. Sujeitos humanos saudáveis contêm anticorpos contra emaranhados neurofibrilares. Marcação imunohistoquímica com anticorpos de pacientes saudáveis em secções cerebrais obtidas a partir de pacientes com doença de Alzheimer patologicamente confirmada revela anticorpos que se ligam aos emaranhados neurofibrilares, confirmado por um anticorpo conhecido contra a tau humana.

Fig. 3: Anticorpo contra neurites distróficas. **A:** Anticorpos humanos. **B:** Marcação controlo com um anticorpo conhecido contra a tau humana. Sujeitos humanos saudáveis contêm anticorpos contra neurites distróficas. Marcação imunohistoquímica com anticorpos de sujeitos saudáveis em secções cerebrais obtidas a partir de pacientes com doença de Alzheimer patologicamente confirmada revela anticorpos que se ligam às neurites distróficas.

Fig. 4: Anticorpo contra beta-amiloide. A figura apresenta a ligação especifica do anticorpo humano recombinante N1-101.11, isolado a partir de um paciente com a doença de Alzheimer invulgarmente estável clinicamente, a placas cerebrais de beta-amiloide. Secções cerebrais obtidas de um paciente com a doença de Alzheimer neuropatologicamente confirmada foram marcadas com anticorpo recombinante humano, utilizado nas concentrações indicadas. A ligação do anticorpo a placas de beta-amiloide com concentrações de 50 pM sugere uma elevada afinidade de ligação.

Fig. 5: A ligação do anticorpo recombinante humano NI-101.11 às placas de beta-amiloide não sofre competição por parte de polipéptidos lineares sintéticos Abeta N-terminais. A ligação do anticorpo recombinante contra a beta-amiloide cerebral (0.5 nM) não sofre competição por polipéptidos N-terminais derivados de Abeta representado as posições 1 a 16, a concentrações até cerca de 1 µM.

Fig. 6: O anticorpo humano NI-101.11 reconhece o epítopo conformacional Abeta que não se encontra presente na Abeta monomérica. A ligação de NI-101.11 a placas de beta-amiloide em secções cerebrais pode sofrer competição por parte de fibrilas Abetal-42, mas não por parte de monómeros Abetal-42 lineares sintéticos.

Fig. 7: O anticorpo humano recombinante NI-101.11 não se liga a Abeta linear, monomérica e sintética em *Western-blots*. Preparações de Abeta monomérica foram separadas por PAGE não-desnaturante. Depois do *blot*, as proteínas foram sondadas com o anticorpo humano recombinante contra a beta-amiloide e anticorpos de controlo contra sequências N-terminais lineares Abeta (6E10). Não foi detetada qualquer ligação de NI101.11 a Abeta monomérica. Esta observação sugere que o anticorpo reconhece um epítopo Abeta conformacional.

Fig. 8: O anticorpo humano NI-101.11 liga-se a fibrilas amiloides artificiais preparadas a partir de péptidos sintéticos Abetal-42. Fibrilas sintéticas Abeta, ou Abeta sintética monomérica, revestidas em placas de ELISA em densidades de revestimento iguais foram incubadas com anticorpos humanos recombinantes contra beta-amiloide cerebral nas concentrações indicadas. A atividade de ligação do anticorpo humano contra beta-amiloide cerebral em fibrilas amiloides artificiais (quadrados não preenchidos) é mais do que 100 vezes maior quando comparado com Abeta monomérica (quadrados preenchidos). O anticorpo de controlo

22C4 liga-se preferencialmente a Abeta monomérica (círculos preenchidos), ligando-se menos bem a fibrilas (círculos não preenchidos). Isto sugere que o anticorpo NI-101.11 reconhece um epítopo conformacional que também se encontra presente em fibrilas amiloides artificiais preparadas a partir de péptidos sintéticos Abeta.

Fig. 9: Ausência de reatividade cruzada do anticorpo recombinante humano NI-101.11 contra APP celular de sequência completa *(full-lenght)*, ou com qualquer dos seus derivativos fisiológicos ocorrentes em células de cultura. Em contraste com o anticorpo de controlo (6E10), que se liga a APP de superfície celular, a ligação de NI-101.11 a APP de sequência completa presente em superfícies celulares não ocorre. Estes dados demonstram a ausência de reatividade cruzada do anticorpo NI-101.11 contra APP celular fisiológica de sequência completa.

Fig. 10A-C: Ausência de ligação do anticorpo NI-101.11 a Abeta monomérica através de cromatografia de exclusão molecular. As figuras 10A e 10B demonstram a ausência de ligação do anticorpo NI-101.11, ou um anticorpo não relacionado de controlo, a Abeta1-42 monomérica marcada com FITC, enquanto que a figura 10C apresenta a ligação proeminente do anticorpo 22C4, que reconhece um epítopo linear presente no C-terminal de Abeta.

Fig. 11: Ensaio de ELISA competitivo demonstrando que a ligação do anticorpo 6E10, um anticorpo direcionado contra um epítopo linear no N-terminal de Abeta, pode ser completamente bloqueada após a pré-incubação com concentrações em excesso de péptidos Abeta monoméricos, enquanto que a pré-incubação com concentrações em excesso destas preparações de péptidos Abeta monoméricos não aboliu a ligação do anticorpo NI-101.11.

Fig. 15: O anticorpo recombinante humano NI-101.11 contra a beta-amiloide cerebral atravessa a barreira

hematoencefálica num modelo de murganho transgénico da doença de Alzheimer, e liga-se a placas cerebrais de beta-amiloide *in vivo*.

Fig. 16A-B: O anticorpo recombinante humano NI-101.11 melhora o comportamento anormal cognitivo num modelo murganho transgénico da doença de Alzheimer. Murganhos arcAbeta com 24 meses de idade foram tratados semanalmente, intraperitonealmente, com 3 mg/kg de anticorpo durante 2 meses. O teste comportamental do labirinto em Y foi realizado antes e depois da conclusão do tratamento.

Fig. 17: Penetração da barreira hematoencefálica e decoração de placas amiloides por NI-101.11 administrado perifericamente. O anticorpo NI-101.11 consegue atravessar a barreira hematoencefálica e ligar-se a depósitos de beta-amiloide em murganhos tratados com NI-101.11 (painel esquerdo), enquanto que nenhuma marcação é visível em animais tratados com o anticorpo humano de controlo (painel direito). O anticorpo humano recombinante NI-101.11 reduz a carga de placas cerebrais de beta-amiloide após tratamento sistémico durante dois meses.

Fig. 18: A imunização passiva com o anticorpo NI-101.11 reduz a carga beta-amiloide em murganhos arcAbeta. (A, B) Análises de carga de placas com Tioflavina S *(Thioflavin S)* e Vermelho do Congo *(Congo Red)*, revelam reduções significativas de mais do que 50% comparativamente aos animais tratados com o anticorpo de controlo (Mann-Whitney U; p=0.02 para o córtex, p=0.009 para o hipocampo para TioS e p=0.009 para o córtex e p=0.04 para o hipocampo para a análise com Vermelho do Congo). Barra de escala: 200 µm.(C-E) A análise com Tioflavina S revelou uma redução significativa na carga beta-amiloide (C), número de placas de beta-amiloide (D) e tamanho médio das placas (E) em murganhos arcAbeta tratados com o anticorpo NI-101.11 comparativamente aos animais tratados com o controlo.

Estatísticas Mann-Whitney U: p=0.02 para a área das placas no córtex; p=0.009 para a área das placas no hipocampo; p=0.047 para o número de placas no córtex; p=0.047 para o número de placas no hipocampo; p=0.009 para o tamanho das placas no córtex; p=0.009 para o tamanho das placas no hipocampo.

Fig. 19: Uma carga beta-amiloide reduzida é acompanhada por um decréscimo de astrocitose e microgliose. A) A quantificação de marcação anti-GFAP revelou uma redução significativa do número de astrócitos reativos no córtex de murganhos arcAbeta tratados com o anticorpo NI-101.11 comparativamente aos transgénicos tratados com o controlo. B) A quantificação da marcação Iba-1 demonstrou uma tendência para um número reduzido de microglia ativada no córtex e hipocampo de murganhos tratados com o anticorpo NI-101.11. Barra de escala: 200 µm.

Fig. 20: Ausência do aumento de micro-hemorragias cerebrais após dois meses de tratamento com o anticorpo humano recombinante NI-101.11. Murganhos arcAbeta de 24 meses de idade com angiopatia amiloide congénita maciça comprovada foram tratados semanalmente, intraperitonealmente, com 3 mg/kg de anticorpo durante 2 meses. Uma imagem representativa de uma micro-hemorragia cerebral em murganhos arcAbeta revelada por marcação com Azul Prussiano de Perl *(Perl's Prussian blue)* (esquerda). A anàlise quantitativa demonstra uma frequência significativamente elevada de micro-hemorragias em murganhos transgénicos arcAbeta comparativamente com os murganhos selvagens *(wild-type)* da mesma ninhada. O tratamento crónico com NI-101.11 não resultou em aumento da frequência de microhemorragias. Barra de escala: 20 µm.

Fig. 21: O anticorpo humano recombinante NI-101.11 inibe a formação de fibrilas Abeta sintéticas *in vitro*. O efeito do anticorpo humano recombinante NI-101.11 na

formação de fibrilas Abeta foi avaliado através da medição de Tioflavina S ligada a Abeta agregada por análise de fluorescência.

Fig. 22: A fagocitose mediada por, e dependente da dose de, anticorpo de fibrilas FITC-Abetal-42 por células microgliais BV-2 foi medida após inibição do sistema de recetores *scavenger*. O anticorpo NI-101.11 desencadeia uma fagocitose potente, e dependente da dose, de fibrilas Abeta mediada pelo recetor Fc-gama.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Definições

[0013] Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são aqui utilizados indistintamente. Um anticorpo, ou imunoglobulina, é uma molécula com capacidade de se ligar a um antigénio que compreende pelo menos uma região variável de uma cadeia pesada, e contém normalmente pelo menos os domínios variáveis de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve. As estruturas básicas das imunoglobulinas em sistemas vertebrados são relativamente bem compreendidas. Ver, *e.g.*, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988).

[0014] Tal como será discutido em maior detalhe em baixo, o termo "imunoglobulina" compreende várias classes amplas de polipéptidos que podem ser distinguidos bioquímicamente. Os peritos na arte serão capaz de apreciar que as cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta ou epsílon, (γ, μ, α, δ, ε), com algumas subclasses entre elas (por exemplo, γ1-γ4). É a natureza desta cadeia que determina a "classe" do anticorpo enquanto IgG, IgM, IgA, IgD, ou IgE, respetivamente. As subclasses de imunoglobulinas (isotipos),

e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., encontram-se bem caraterizadas e são conhecidas por conferir especialização funcional. As versões modificadas de cada uma destas classes e isotipos são prontamente discerníveis para um perito na arte em vista da presente divulgação, e, consequentemente, encontram-se dentro do âmbito da presente invenção. Embora todas as classes de imunoglobulinas se encontram claramente dentro do âmbito da presente invenção, a discussão seguinte será geralmente direcionada para moléculas de imunoglobulina da classe IgG. Em relação à classe IgG, a molécula de imunoglobulina padrão compreende dois polipéptidos de cadeia leve idênticos, de peso molecular de aproximadamente 23,000 Daltons, e dois polipéptidos de cadeia pesada idênticos de peso molecular de aproximadamente 53,000-70,000 Daltons. As quatros cadeias encontram-se tipicamente unidas por pontes dissulfeto numa configuração em "Y" em que as cadeias leves envolvem as cadeias pesadas, começando na boca da estrutura em "Y" e continuando ao longo da região variável.

[0015] As cadeias leves são classificadas enquanto kappa e lambda (κ, λ). Cada classe de cadeia pesada pode ligar-se a uma cadeia leve kappa ou lambda. Geralmente, as cadeias leves e pesadas encontram-se covalentemente ligadas, e as porções de "cauda" das duas cadeias pesadas encontram-se ligadas por ligações covalentes dissulfeto ou ligações não covalentes quando as imunoglobulinas são geradas por hibridomas, células B ou células hospedeiras geneticamente modificas. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácidos estendem-se a partir de uma região N-terminal nas extremidades bifurcadas da configuração em Y até à região C-terminal no fundo de cada cadeia.

[0016] Tanto as cadeias leves como as cadeias pesadas encontram-se divididas em regiões de homologia estrutural e

funcional. Os termos "constante" e "variável" são utilizados funcionalmente. A este respeito, será apreciado que os domínios variáveis de tanto as porções da cadeia leve (VL) e pesada (VH) determinam o reconhecimento e a especificidade contra o antigénio. Por outro lado, os domínios constantes da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH1 CH2 ou CH3) conferem propriedades biológicas importantes tais como secreção, mobilidade transplacentária, ligação aos recetores Fc, ligação ao complemento, e semelhantes. Por convenção, a numeração dos domínios de região constante aumenta à medida que estes se encontram em posições mais distais do local de ligação do antigénio ou amino-término do anticorpo. A porção N-terminal é uma região variável e a porção C-terminal é uma região constante; os domínios CH3 e CL contêm na realidade o terminal carboxílico da cadeia pesada e leve, respetivamente.

[0017] Tal como acima indicado, a região variável permite que o anticorpo reconheça seletivamente e se ligue especificamente a epítopos ou antigénios. Isto é, o domínio VL e o domínio VH, ou o subconjunto das regiões determinantes de complementaridade (CDRs), de um anticorpo combinam-se para formar a região variável que define um local tridimensional de ligação ao antigénio. Esta estrutura quaternária do anticorpo forma o local de ligação ao antigénio presente no final de cada braço da estrutra em Y. Mais especificamente, o local de ligação ao antigénio é definido por três CDRs em cada uma das cadeias VH e VL. Qualquer anticorpo ou fragmento de imunoglobulina que contenha estrutura suficiente para se ligar especificamente a um antigénio é aqui indicada indistintamente como um "fragmento de ligação a antigénio" ou um "fragmento imunoespecífico".

[0018] Em anticorpos naturalmente ocorrentes, as seis "regiões determinantes de complementaridade", ou "CDRs", presentes em cada domínio de ligação a antigénio são sequências de aminoácidos pequenas e não-contíguas que se encontram especificamente posicionadas para formar o domínio de ligação ao antigénio quando o anticorpo assume a sua configuração tridimensional num ambiente aquoso. Os aminoácidos restantes dos domínios de ligação ao antigénio, referidos como regiões de "estrutura" (*"framework"*), apresentam uma menor variabilidade inter-molecular. As regiões de estrutura adotam geralmente uma conformação de folha-β e as CDRs formam *loops* que se ligam, e em alguns casos formam parte da estrutura de folha-β. Assim, as regiões de estrutura agem por forma a criar um esqueleto que possibilite o posicionamento das CDRs na orientação correta através de interações não-covalentes entre cadeias. O domínio de ligação a antigénio formado pelas CDRs posicionadas define uma superfície de complementaridade ao epitopo no antígénio imunoreativo. Esta superfície de complementaridade promove a ligação não-covalente do anticorpo ao seu epítopo cognato. Os aminoácidos compreendendo as regiões CDRs e de estrutura, respetivamente, podem ser prontamente identificados para uma qualquer região variável de cadeia pesada ou leve por um perito na arte, uma vez que estes foram definidos com precisão (ver, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); e Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987).

[0019] No caso de haver duas ou mais definições de um termo que é utilizado e/ou aceite no estado da arte, a definição do termo tal como aqui utilizado pretende incluir todos estes significados exceto se for explicitamente indicado o

contrário. Um exemplo específico é a utilização do termo "região determinante de complementaridade" ("CDR") para descrever os locais de combinação antigênica não-contíguos encontrados no interior da região variável de tanto os polipéptidos da cadeia leve como os da cadeia pesada. Esta região particular foi descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) e by Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), em que as definições incluem sobreposições ou conjuntos de resíduos de aminoácidos quando comparados entre eles. Todavia, a aplicação de qualquer uma das definições para fazer referência a uma região CDR de um anticorpo, ou variantes deste, pretende ser feita no âmbito do termo tal como definido e aqui utilizado. Os resíduos de aminoácidos apropriados que englobam as regiões CDRs, tal como definido por cada uma das referências acima citadas, são apresentados em baixo na Tabela 1 como comparação. Os números dos resíduos exatos que englobam uma região CDR particular variam, dependendo da sequência e tamanho da região CDR. Os peritos na arte podem determinar rotineiramente quais os resíduos que compreendem uma região CDR particular dada a sequência de aminoácidos da região variável do anticorpo.

Tabela 1: Definições CDR[1]

	Kabat	**Chothia**
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[1]A numeração de todas as definições CDR na Tabela 1 está de acordo com as convenções de numeração estabelecidas por Kabat *et al.* (ver em baixo).

[0020] Kabat *et al.* também definiu um sistema de numeração para sequências do domínio variável que é aplicável a qualquer anticorpo. Um perito na arte pode utilizar inequivocamente este sistema de "numeração Kabat" para qualquer sequência de domínio variável, sem depender de outros dados experimentais que não sejam a própria sequência. Tal como aqui utilizado, "numeração Kabat" refere-se ao sistema de numeração estabelecido por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Salvo especificação em contrário, as referências à numeração de posições de resíduos específicos de aminoácidos num anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste, da presente invenção são de acordo com o sistema de numeração Kabat.

[0021] Anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, fragmentos imunoespecíficos, variantes, ou derivados destes, da invenção incluem, mas não se encontram limitados a, anticorpos policlonais, monoclonais, multi-específicos, humanos, humanizados, primatizados, ou quiméricos, anticorpos de cadeia simples, fragmentos de ligação a epítopos, *e.g.*, Fab, Fab' e $F(ab')_2$, Fd, Fvs, Fvs de cadeia simples (scFv), anticorpos de cadeia simples, Fvs ligados por pontes dissulfeto (sdFv), fragmentos contendo um domínio VL ou VH, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão Fab, e anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, *e.g.*, anticorpos anti-Id para anticorpos aqui divulgados). As moléculas ScFv são conhecidas no estado da arte e são descritas, *e.g.*, no Pedido de Patente E.U.A.

5,892,019. As moléculas de imunoglobulina ou anticorpo da invenção podem ser de qualquer tipo (*e.g.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), classe (*e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de moléculas de imunoglobulina.

[0022] Numa forma de realização prática da presente invenção, o anticorpo da presente invenção não é uma IgM, ou um derivativo desta, com uma estrutura pentavalente. Em particular, em aplicações específicas da presente invenção, especialmente para utilização terapêutica, as IgMs são menos úteis que IgG e outros anticorpos bivalentes, ou moléculas de ligação correspondentes, visto que as IgMs, devido à sua estrutura pentavalente e falta de maturação de afinidade, apresentam regularmente reatividades cruzadas inespecíficas e afinidades muito baixas.

[0023] Fragmentos de anticorpos, incluindo anticorpos de cadeia simples, podem compreender as regiões variáveis isoladamente ou em combinação com a totalidade, ou uma porção, das seguintes: região de dobradiça, domínios CH1, CH2 e CH3. Também se encontram incluídos na invenção fragmentos de ligação a antigénio que também compreendem qualquer combinação de regiões variáveis com uma região de dobradiça, domínios CH1, CH2 e CH3. Anticorpos, ou fragmentos imunoespecíficos destes, da presente invenção podem ser de qualquer origem animal, incluindo de aves e de mamífero. Preferencialmente, os anticorpos são anticorpos humanos, murinos, de burro, de coelho, caprinos, de porquinho-da-Índia, de camelo, de lama, de cavalo, ou de galinha. Numa outra forma de realização prática da presente invenção, a região variável pode ser de origem condrictóide (*e.g.*, de tubarões). Tal como aqui utilizado, anticorpos "humanos" inclui anticorpos contendo a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e inclui anticorpos isolados a partir

de pacientes humanos, de bibliotecas de imunoglobulinas humanas, ou de animais transgénicos para uma ou mais imunoglobulinas humanas e que não expressam imunoglobulinas endógenas, tal como, por exemplo, no Pedido de Patente E.U.A. 5,939,598 por Kucherlapati *et al.* Um anticorpo humano é ainda considerado "humano" mesmo que tenham sido efetuadas substituições de aminoácidos no anticorpo, *e.g.*, para melhorar as características de ligação.

[0024] Tal como aqui utilizado, o termo "porção de cadeia pesada" inclui sequências de aminoácidos derivadas a partir de uma cadeia pesada de imunoglobulinas. Um polipéptido contendo uma porção de cadeia pesada compreende pelo menos um de: um domínio CH1, uma região de dobradiça (*e.g.*, região de dobradiça superior, média e/ou inferior), um domínio CH2, um domínio CH3, ou uma variante ou fragmento deste. Por exemplo, um polipéptido de ligação para utilização na invenção pode conter uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio CH1; uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça, e um domínio CH2; uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio CH1 e um domínio CH3; uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça, e uma região CH3, ou uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça, um domínio CH2, e um domínio CH3. Noutra forma de realização prática da presente invenção, um polipéptido da invenção compreende uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio CH3. Além disso, um polipéptido de ligação para utilização na invenção pode não conter pelo menos uma porção do domínio CH2 (*e.g.*, a totalidade ou uma parte do domínio CH2). Conforme acima estabelecido, será entendido por um perito na arte que estes domínios (*e.g.*, as porções de cadeia pesada) podem ser

modificados de forma que variem na sequência de aminoácidos em relação às moléculas de imunoglobulinas naturalmente ocorrentes.

[0025] Em determinados anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, aqui divulgados, as porções de cadeia pesada de uma cadeia polipeptídica de um multímero são idênticas às presentes numa segunda cadeia polipeptídica do multímero. Alternativamente, os monómeros que contêm as porções de cadeia pesada da invenção não são idênticos. Por exemplo, cada monómero pode compreender um local de ligação ao alvo diferente, formando, por exemplo, um anticorpo biespecífico.

[0026] As porções de cadeia pesada de um polipéptido de ligação para utilização nos métodos de diagnóstico e tratamento aqui divulgados podem ser derivados de moléculas de imunoglobulina diferentes. Por exemplo, a porção de cadeia pesada de um polipéptido pode compreender um domínio CH1 derivado de uma molécula IgG1 e uma região de dobradiça derivada de uma molécula IgG3. Noutro exemplo, a porção de cadeia pesada pode compreender uma região de dobradiça derivada, em parte, de uma molécula IgG1 e, em parte, de uma molécula IgG3. Noutro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode compreender uma região de dobradiça quimérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula IgG4.

[0027] Tal como aqui utilizado, o termo "porção de cadeia leve" inclui sequências de aminoácidos derivadas de uma cadeia leve de imunoglobulina. Preferencialmente, a porção de cadeia leve compreende pelo menos um de um domínio VL ou CL.

[0028] O tamanho mínimo de um péptido ou polipéptido de epítopo para um anticorpo é considerado como sendo cerca de quatro a cinco aminoácidos. Os péptidos ou polipéptidos de epítopo contêm preferencialmente pelo menos sete, mais preferencialmente pelo menos nove, e mais preferencialmente pelo menos entre cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos. Uma vez que uma região CDR pode reconhecer um péptido ou polipéptido antigénico na sua forma terciária, os aminoácidos compreendendo o epítopo não necessitam de ser contíguos, e em alguns casos, podem nem estar contidos na mesma cadeia peptídica. Na presente invenção, o péptido ou polipéptido de epítopo reconhecido pelos anticorpos da presente invenção contém uma sequência de pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, mais preferencialmente pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, ou entre cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos contíguos, ou não-contíguos, de Aβ.

[0029] O termo "neo-epítopo", de acordo com a presente invenção, designa um epitopo que é único para um padrão de doença e contido, ou formado, por uma proteína associada a doença que é uma variante patológica de uma proteína, de outra forma, não patológica e/ou desviando-se da fisiologia do estado saudável. As referidas variantes patofisiológicas podem ser formadas por meio de transcrição alterada patologicamente, modificação pós-tradução alterada patologicamente, processamento proteolítico patologicamente alterado, formação de complexos com parceiros de interação patológicos ou patofisiológicos ou estruturas celulares potlogicamente alteradas no sentido de uma co-localização alterada, ou uma conformação estrutural patologicamente alterada - tal como por exemplo agregação, oligomerização ou fibrilação - cuja estrutura tri ou tetra-dimensional difere da estrutra da molécula fisiologicamente ativa. Para além

disso, uma variante patofisiológica pode também ser caracterizada pelo facto de não se encontrar localizada no seu ambiente fisiológico ou compartimento subcelular normal. Como exemplo, os neo-epítopos podem encontrar-se localizados nas estruturas patológicas visíveis nas áreas de tecidos cerebrais que estão a experienciar de forma óbvia, ou já experienciaram, danos funcionais. A presença de um neo-epítopo numa determinada estrutura, por exemplo numa célula, num tecido, ou numa proteína pode ser verificada através da reversão do método abaixo descrito para o isolamento e caracterização de uma molécula de ligação específica a uma proteína associada a uma doença, em que a molécula de ligação, por exemplo um anticorpo, identificada por este método é utilizada para rastrear uma amostra para a ligação ao anticorpo, desta forma determinado a presença de um neo-epítopo.

[0030] As frases "específico de proteína associada a doença" e "específico de neo-epítopo" são aqui utilizadas indistintamente com o termo "reconhece especificamente um neo-epítopo". Tal como aqui utilizado, termos como a "ausência de reatividade cruzada", "específico", " reconhecendo especificamente", "ligando-se especificamente", "ligando-se preferencialmente", e semelhantes referem-se à capacidade das moléculas de ligação para discriminarem entre o neo-epítopo de uma proteína associada a uma doença e a proteína nativa na sua forma naturalmente ocorrente e no seu contexto natural. Assim, a molécula de ligação da presente invenção tem uma afinidade de ligação preferencial ao neo-epítopo em relação ao antigénio da proteína nativa por um fator de pelo menos duas vezes, preferencialmente pelo menos 5 vezes, usualmente mais do que um fator de 10 vezes, particularmente preferencial um fator de 50 vezes e ainda mais preferencialmente um fator

maior do que 100 vezes. Para além disto, a K_D relativa da molécula de ligação, *e.g.*, anticorpo para o epitopo alvo específico, *e.g.*, neo-epítopo, é preferencialmente pelo menos 10 vezes menos, mais preferencialmente pelo menos 100 vezes menos ou maior do que a K_D para a ligação do anticorpo a outros ligandos ou para a ligação à contraparte nativa da proteína associada a doença.

[0031] Por "liga-se especificamente", ou "reconhece especificamente", aqui utilizados indistintamente, pretende-se significar geralmente que uma molécula de ligação, *e.g.*, um anticorpo, se liga a um epitopo através do seu domínio de ligação a antigénio, e que a ligação implica alguma complementaridade entre o domínio de ligação a antigénio e o epítopo. De acordo com esta definição, um anticorpo é descrito como "ligando-se especificamente" a um epítopo quando este se liga àquele epítopo, através do seu domínio de ligação a antigénio mais prontamente do que se ligaria a um epitopo aleatório, não relacionado. O termo "especificidade" é aqui utilizado para qualificar a afinidade relativa pela qual um determinado anticorpo se liga a um determinado epítopo. Por exemplo, um anticorpo "A" pode ser considerado como tendo uma maior especificidade para um determinado epítopo do que um anticorpo "B", ou um anticorpo "A" pode ser referido como se ligando ao epítopo "C" com uma maior especificidade do que a que possui para o epítopo relacionado "D".

[0032] Por "liga-se preferencialmente", pretende-se significar que a molécula de ligação, *e.g.*, anticorpo, se liga especificamente a um epítopo mais prontamente do que ele se ligaria a um epítopo relacionado, semelhante, homólogo ou análogo. Assim, um anticorpo que "se liga preferencialmente" a um determinado epítopo ligar-se-ia com

uma maior probabilidade a esse epítopo do que a um epítopo relacionado, mesmo que um tal anticorpo pudesse apresentar uma reatividade cruzada com o epítopo relacionado.

[0033] A título de exemplo não limitativo, uma molécula de ligação, *e.g.*, um anticorpo, pode ser considerado como se ligando a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se liga ao referido primeiro epítopo com uma constante de dissociação (K_D) que é menor do que o K_D do anticorpo para o segundo epítopo. Noutro exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado como se ligando a um primeiro antigénio preferencialmente se ele se liga ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos uma ordem de magnitude menor que a K_D do anticorpo para o segundo epítopo. Noutro exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado como se ligando a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epítopo com uma afinidade que é pelo menos duas ordens de magnitude menor do que a K_D do anticorpo para o segundo epítopo.

[0034] Noutro exemplo não limitativo, uma molécula de ligação, *e.g.*, um anticorpo, pode ser considerado como se ligando a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epítopo com uma *off rate (k(off))* que é menor do que a k(off) do anticorpo para o segundo epítopo. Noutro exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado como se ligando a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epítopo com uma afinidade pelo menos uma ordem de magnitude menor que o k(off) do anticorpo para o segundo epítopo. Noutro exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado como se ligando a um primeiro epítopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epítopo com uma afinidade pelo menos duas

ordens de magnitude menor do que o k(off) do anticorpo para o segundo epítopo.

[0035] Uma molécula de ligação, *e.g.*, um anticorpo, ou um fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo aqui divulgado pode ser referido como se ligando a um polipéptido alvo aqui divulgado, ou um fragmento ou derivado deste, com uma *off rate (k(off))* menor ou igual a 5 X 10^{-2} sec^{-1}, 10^{-2} sec^{-1}, 5 X 10^{-3} sec^{-1} ou 10^{-3} sec^{-1}. Mais preferencialmente, um anticorpo da invenção pode ser referido como se ligando a um polipéptido alvo aqui divulgado, ou um fragmento ou derivado deste, com uma *off rate (k(off))* menor ou igual a 5 X 10^{-4} sec^{-1}, 10^{-4} sec^{-1}, 5 X 10^{-5} sec^{-1} ou 10^{-5} sec^{-1}, 5 X 10^{-6} sec^{-1}, 10^{-6} sec^{-1}, 5 X 10^{-7} sec^{-1} ou 10^{-7} sec^{-1}.

[0036] Uma molécula de ligação, *e.g.*, um anticorpo, ou um fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo aqui divulgado pode ser referido como se ligando a um polipéptido alvo aqui divulgado, ou um fragmento ou derivado deste, com uma *on rate (k(on))* maior ou igual 10^{3} M^{-1} sec^{-1}, 5 x 10^{3} M^{-1} sec^{-1}, 10^{4} M^{-1} sec^{-1} ou 5 x 10^{4} M^{-1} sec^{-1}. Mais preferencialmente, um anticorpo da invenção pode ser referido como se ligando a um polipéptido alvo aqui divulgado, ou um fragmento ou derivado deste, com uma *on rate (k(on))* maior ou igual a 10^{5} M^{-1} sec^{-1}, 5 x 10^{5} M^{-1} sec^{-1}, 10^{6} M^{-1} sec^{-1}, ou 5 x 10^{6} M^{-1} sec^{-1}, ou 10^{7} M^{-1} sec^{-1}.

[0037] Uma molécula de ligação, *e.g.*, um anticorpo, é referida como inibindo competitivamente a ligação de um anticorpo de referência a um determinado epítopo se este se ligar preferencialmente àquele epítopo na medida em que bloqueia, até certo ponto, a ligação do anticorpo de referência ao epítopo. A inibição competitiva pode ser

determinada por qualquer método conhecido no estado da arte, por exemplo, ensaios de ELISA competitivos. Um anticorpo pode ser referido como inibindo competitivamente a ligação de um anticorpo de referência a um determinado epítopo por pelo menos 90%, por pelo menos 80%, por pelo menos 70%, por pelo menos 60%, ou por pelo menos 50%.

[0038] Tal como aqui utilizado, o termo "afinidade" refere-se à medida da força da ligação de um epítopo individual com a região CDR da molécula de ligação, *e.g.*, uma molécula de imunoglobulina. Ver, *e.g.*, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988), páginas 27-28. Tal como aqui utilizado, o termo "avidez" refere-se à estabilidade geral do complexo formado entre a população de imunoglobulinas e um antigénio, isto é, a força de combinação funcional de uma mistura de imunoglobulinas com o antigénio. Ver, *e.g.*, Harlow, páginas 29-34. A avidez relaciona-se com a afinidade das moléculas individuais de imunoglobulinas na população com epitopos específicos, e também com as valências das imunoglobulinas e do antigénio. Por exemplo, a interação entre um anticorpo monoclonal bivalente e um antigénio com uma estrutura de epítopo altamente repetitiva, tal como um polímero, seria de uma alta avidez.

[0039] Moléculas de ligação, *e.g.*, anticorpos ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes ou derivativos deste da invenção podem também ser descritos ou especificados em termos da sua reatividade cruzada. Tal como aqui utilizado, o termo "reatividade cruzada" refere-se à capacidade de um anticorpo, específico para um antigénio, para reagir com um segundo antigénio; uma medida do grau de relação entre duas substâncias antigénicas diferentes. Assim, um anticorpo apresenta reatividade cruzada se este se liga a um epítopo

diferente daquele que induziu a sua formação. O epítopo para o qual o anticorpo apresenta reatividade cruzada contém, geralmente, muitas das mesmas características estruturais de complementaridade que o epítopo indutor, e em alguns casos, pode inclusive encaixar melhor do que o epítopo original.

[0040] Por exemplo, alguns anticorpos têm algum grau de reatividade cruzada, na medida em que se ligam a epítopos relacionados mas não idênticos, *e.g.*, epítopos com pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 65%, pelo menos 60%, pelo menos 55%, e pelo menos 50% de identidade (tal como calculado utilizando métodos conhecidos no estado da arte e aqui descritos) com um epítopo de referência. Pode referir-se que um anticorpo tem pouca ou nenhuma reatividade cruzada se não se ligar a epítopos com menos do que 95%, menos do que 90%, menos do que 85%, menos do que 80%, menos do que 75%, menos do que 70%, menos do que 65%, menos do que 60%, menos do que 55%, e menos do que 50% de identidade (tal como calculado utilizando métodos conhecidos no estado da arte e aqui descritos) com um epítopo de referência. Um anticorpo pode ser considerado "altamente especifico" para um determinado epítopo, se este não se ligar a qualquer outro análogo, ortólogo, ou homólogo daquele epítopo.

[0041] Moléculas de ligação, *e.g.*, anticorpos ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes ou derivativos destes da invenção podem também ser descritos ou especificados em termos da sua afinidade de ligação a um polipéptido da invenção. As afinidades de ligação preferenciais incluem aquelas com uma constante de dissociação, ou K_D, menor do que 5×10^{-2}M, 10^{-2}M, 5×10^{-3}M, 10^{-3}M, 5×10^{-4}M, 10^{-4}M, 5×10^{-5}M, 10^{-5}M, 5×10^{-6}M, 10^{-6}M, 5×10^{-7}M, 10^{-7}M, 5×10^{-8}M, 10^{-8}M, 5×10^{-9}M, 10^{-9}M, 5×10^{-10}M, 10^{-10}M, 5×10^{-11}M, 10^{-11}M, $5 \times$

10^{-12}M, 10^{-13}M, 5 x 10^{-13}M, 10^{-14}M, 5 x 10^{-14}M, 10^{-14}M, 5 x 10^{-15}M ou 10^{-15}M.

[0042] Tal como previamente indicado, as subunidades estruturais e a configuração tridimensional das regiões constantes de várias classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Tal como aqui utilizado, o termo "domínio VH" inclui o domínio variável amino terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina, e o termo "domínio CH1" inclui o primeiro domínio (geralmente amino terminal) de região constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina. O domínio CH1 é adjacente ao domínio VH e é amino terminal em relação à região de dobradiça de uma cadeia pesada de uma molécula de imunoglobulina.

[0043] Tal como aqui utilizado, o termo "domínio CH2" inclui a porção da molécula de cadeia pesada que se estende, e.g., desde cerca do resíduo 244 ao resíduo 360 de um anticorpo utilizando esquemas de numeração convencionais (resíduos 244 a 360, sistema de numeração Kabat; e resíduos 231-340, sistema de numeração EU; ver Kabat EA *et al. op. cit.* O domínio CH2 é único no sentido em que não se encontra proximamente emparelhado com outro domínio. Ao invés, duas cadeias de carbohidratos ramificados N-ligadas encontram-se interpostas entre os dois domínios CH2 de uma molécula intacta nativa IgG. Também se encontra bem documentado que o domínio CH3 se estende desde o domínio CH2 ao terminal carboxílico da molécula de IgG e compreende aproximadamente 108 resíduos.

[0044] Tal como aqui utilizado, o termo "região de dobradiça" inclui a porção da molécula de cadeia pesada que une o domínio CH1 ao domínio CH2. Esta região de dobradiça compreende aproximadamente 25 resíduos e é flexível,

permitindo que as duas regiões de ligação ao antigénio N-terminais se movam independentemente. As regiões de dobradiça podem ser subdivididas em três domínios distintos: domínio da região de dobradiça superior, médio e inferior (Roux *et al.*, J. Immunol. 161:4083 (1998)).

[0045] Tal como aqui utilizado, o termo "ligação por ponte dissulfeto" inclui a ligação covalente formada entre dois átomos de enxofre. O aminoácido cisteína contém um grupo tiol que pode formar ligações por pontes dissulfeto com um segundo grupo tiol. Na maioria das moléculas de IgG naturalmente ocorrentes, as regiões CH1 e CL encontram-se ligadas por uma ponte dissulfeto e as duas cadeias pesadas encontram-se ligadas por duas pontes dissulfeto nas posições correspondentes às posições 239 e 242 utilizando o sistema de numeração Kabat (posição 226 ou 229, sistema de numeração EU).

[0046] Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo manipulado" refere-se a um anticorpo no qual o domínio variável na cadeia pesada, na cadeia leve ou em ambas as cadeias, é alterado por pelo menos a substituição parcial de uma ou mais regiões CDRs de um anticorpo de especificidade conhecida e, se necessário, por substituição parcial da região de estrutura e alterção da sequência. Embora as regiões CDRs possam ser derivadas de um anticorpo da mesma classe, ou mesma subclasse, do que o anticorpo a partir do qual as regiões de estrutura são derivadas, encontra-se previsto que as regiões CDRs serão derivadas a partir de um anticorpo de classe diferente e preferencialmente de um anticorpo de uma espécie diferente. Um anticorpo manipulado em que uma ou mais regiões CDRs "dadoras" de um anticorpo não-humano de especificidade conhecida é enxertada numa região de estrutura de cadeia leve ou pesada humana é aqui

referido como um "anticorpo humanizado". Pode não ser necessário substituir todas as regiões CDR com as regiões CDRs completas da região variável dadora para transferir a capacidade de ligação ao antigénio de um domínio variável para outro. Ao invés, pode apenas ser necessário transferir os resíduos que sejam necessários para manter a atividade do local de ligação alvo. Tendo em conta as explicações estabelecidas em, *e.g.*, Pedido de Patente E.U.A. Nos 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, e 6,180,370, será bem dentro da competência dos peritos na arte obter anticorpos humanizados manipulados funcionais, através da realização de experiências de rotina ou por testes de tentativa e erro.

[0047] Tal como aqui utilizado, os termos "ligados", "fundidos", ou "fusão" são utilizados indistintamente. Estes termos referem-se à união de dois ou mais elementos ou componentes, por qualquer técnica incluindo por conjugação química ou por via recombinante. Uma "fusão dentro da grelha de leitura" *("in-frame fusion")* refere-se à união de duas ou mais grelhas de leitura abertas *(open Reading frames (ORFs))* de policuleótidos para formar uma ORF contínua mais longa, numa forma que mantém a grelha de leitura de tradução correta da ORF original. Assim, uma proteína de fusão recombinante é uma proteína isolada que contém dois ou mais segmentos que correspondem a polipéptidos codificados pelas ORFs originais (cujos segmentos não se encontram normalmente tão unidos na natureza). Apesar das grelhas de leitura serem tornadas contínuas ao longo dos segmentos fundidos, os segmentos podem ser fisicamente ou espacialmente separados por, por exemplo, sequências de ligação dentro da grelha de leitura *(in-frame linker sequence)*. Por exemplo, polinucleótidos codificantes para CDRs de uma região variável de uma imunoglobulina podem ser fundidos, dentro da grelha de leitura *(in-frame)*, mas separados por um polinucleótido codificante para pelo menos

uma região de estrutura de imunoglobulina ou regiões CDRs adicionais, desde que as CDRs "fundidas" sejam co-traduzidas enquanto parte de um polipéptido contínuo.

[0048] Tal como aqui utilizado, os termos "trata" ou "tratamento" referem-se tanto a tratamentos terapêuticos como a medidas profiláticas ou preventivas, em que o objetivo é prevenir ou retardar uma mudança ou desordem fisiológica indesejada, tal como o desenvolvimento ou metastização de cancro. Resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não se encontram limitados a, alívio dos sintomas, diminuição da extensão da doença, a estabilização (ou seja, a não pioria) do estado da doença, o atraso ou desaceleração da progressão da doença, a melhora ou paliação do estado da doença, e a remissão (quer parcial ou total), quer detetável ou indetetável. "Tratamento" pode também significar o prolongar da sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada caso não se recebesse o tratamento. Aqueles com necessidade do tratamento incluem aqueles já com a condição ou doença, tal como os propensos a ter a condição ou doença, ou aqueles em que a manifestação da condição ou doença deva ser prevenida.

[0049] Por "sujeito", ou "indivíduo", ou "animal", ou "paciente", ou "mamífero", pretende-se referir qualquer sujeito, particularmente um sujeito mamífero, *e.g.*, um paciente humano, para o qual é desejado um diagnóstico, um prognóstico, uma prevenção ou terapia.

[0050] A presente invenção refere-se a moléculas de ligação, tal como caraterizadas nas reivindicações, que são capazes de reconhecer seletivamente um epítopo de uma proteína associada a uma doença incluindo um neo-epítopo de uma proteína associada a uma doença, que podem ser

preferencialmente obtidas ou validadas pelo método da presente invenção aqui descrito anteriormente e ilustrado nos exemplos. Vantajosamente, a molécula de ligação da presente invenção não reconhece substancialmente a referida proteína na sua forma não associada a doença; ver também *supra*.

[0051] Meios e métodos para a produção recombinante de moléculas de ligação, em particular anticorpos e mímicos destes, tal como métodos de rastreio para moléculas de ligação competidoras, que podem ou não ser anticorpos, são conhecidos no estado da arte e encontram-se sumarizados, por exemplo, na Aplicação Internacional WO2006/103116 no que diz respeito a anticorpos contra a beta-amiloide e o tratamento/diagnóstico da doença de Alzheimer.

[0052] No entanto, tal como aqui descrito, em particular no que diz respeito a aplicações terapêuticas em humanos, o anticorpo da presente invenção é um anticorpo humano. Neste contexto, a variante patológica da proteína reconhecida pelo anticorpo encontra-se associada a uma doença neurológica, *i.e.*, uma doença cerebral.

[0053] Além disso, e tal como demonstrado nos Exemplos 3 a 5, a molécula de ligação da presente invenção, em particular um anticorpo, tem várias propriedades biológicas vantajosas, uma ou mais das quais foram obtidas pela primeira vez na presente invenção, *e.g.*, a molécula de ligação é capaz de:

(i) atravessar a barreira hematoencefálica, por exemplo no local do acontecimento patológico;

(ii) ligar-se a placas de beta-amiloide, amiloide cerebrovascular, depósitos de Abeta difusos, emaranhados

neurofibrilares, tau hiper-fosforilada, corpos de Lewy positivos para alfa-sinucleína ou agregados proteicos associados a neurites distróficas;

(iii) remover placas de beta-amiloide no cérebro e/ou prevenir a formação de placas de beta-amiloide no cérebro;

(iv) restaurar substancialmente o comportamento normal; e/ou

(v) não causar micro-hemorragias.

[0054] Numa forma de realização particularmente preferida, o anticorpo ou molécula de ligação equivalente da presente invenção pode ser distinguida de outros anticorpos por uma ou mais das seguintes propriedades, *e.g.*, sendo capazes de:

1. atravessar, pelo menos em pequenas quantidades, a barreira hematoencefálica no local dos acontecimentos patológicos;

2. ligarem-se a uma ou mais estruturas patofisiológicas relevantes extracelulares ou celulares;

3. levar à redução da estrutura patofisiológica relevante *in vitro* ou *in vivo*;

4. levar à redução da estrutura patofisiologicamente relevante e à redução da toxicidade associada a esta;

5. levar ao bloqueio ou retardamento do processo da doença;

6. levar à regeneração de funções celulares, específicas de órgãos ou organísticas e possivelmente a uma prevenção secundária da recorrência da patofisiologia original após a degradação da toxicidade associada a uma estrutura patofisiologicamente relevante; e/ou

7. não serem associados a aumentos de micro-hemorragias.

[0055] Para além disso, a ausência de reatividade cruzada com precursores biológicos ou derivativos leva à consequência de, primeiramente, as concentrações previstas como *sink effects* em estruturas tecidulares saudáveis sejam evitadas e, segundamente, que respostas autoimunes, no sentido de efeitos secundários indesejados, quase não existam. Adicionalmente, estudos prévios sugerem uma associação entre a angiopatia amiloide cerebral *(cerebral amyloid angiopathy (CAA))* com uma reatividade vascular comprometida num modelo de murganho transgénico com CAA (Mueggler *et al.*, J Neurosci 22 (2002), 7218-24.). A CAA severa ocorrente em murganhos arcAβ idosos (Knobloch *et al.*, Neurobiol. Aging 28:1297-1306 (2007) epub 31 de Julho, 2006) pode assim restringir a flexibilidade vasodilatadora de vasos sanguíneos afetados. De acordo com a presente invenção, é prudente esperar que o tratamento com os anticorpos da presente invenção possa melhorar a vasoreatividade e o fluxo sanguíneo cerebral em murganhos transgénicos APP idosos. Este facto pode ser validado através da utilização do modelo de murganho arcAβ descrito por Knobloch *et al.* (2006), supra, e divulgado na Aplicação E.U.A. "Transgenic animal model for Alzheimer's disease" por Grimm *et al.*, número de série 60/934,291 submetido em 11 de Junho de 2007.

II. Anticorpos

[0056] A presente invenção é ainda direcionada às moléculas de ligação, *e.g.*, anticorpos e fragmentos de ligação, variantes, e derivados destes, apresentados nas Tabelas 2 e 3. A presente invenção é mais especificamente direcionada para um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante ou derivados deste, em que o anticorpo se liga especificamente ao mesmo neo-epítopo de uma proteína associada a uma doença como o anticorpo de referência NI-101.12F6A.

[0057] A presente invenção é ainda desenhada para um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante ou derivativos deste, em que o anticorpo inibe competitivamente a ligação do anticorpo de referência NI-101.12F6A a um neo-epítopo de uma proteína associada a uma doença.

[0058] A invenção é ainda desenhada para um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante ou derivativos deste, em que o anticorpo compreende um domínio de ligação ao antigénio idêntico ao do anticorpo NI-101.12F6A.

[0059] A presente invenção exemplifica ainda várias destas moléculas de ligação, *e.g.*, anticorpos e fragmentos de ligação destes, que podem ser caraterizados por compreenderem na sua região variável, *e.g.*, domínio de ligação, as regiões determinantes de complementaridade (CDR) das regiões variáveis V_H e/ou V_L, compreendendo as sequências de aminoácidos apresentadas na Tabela 2 (V_H) e na Tabela 3 (V_L).

Tabela 2: Sequências de aminoácidos da região V_H de anticorpos beta-amiloide específicos.

Anticorpo	Sequência variável da cadeia pesada

NI-101.11	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWFDGTKKYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAED TAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 6)
NI-101.12F6A	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWFDGTKKYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAED TAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 39)

Tabela 3: Sequências de aminoácidos da região V_L de anticorpos beta-amiloide específicos.

Anticorpo	Sequência variável da cadeia leve (kappa ou lambda)
NI-101.11	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYSTPLTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 8)
NI-101.12F6A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYSTPLLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 41)

[0060] As sequências de nucleótidos codificantes correspondentes para as regiões variáveis acima identificadas são apresentadas na listagem de sequências anexa. O conjunto de regiões CDRs das sequências de aminoácidos acima apresentadas das regiões V_H e V_L, tal como descritas na Tabela 2 e na Tabela 3, é apresentado na Tabela 4. No entanto, tal como a seguir discutido, um perito na arte encontra-se bem ciente do facto de poderem ser utilizadas regiões CDRs adicionais ou alternativas, que diferem na sua sequência de aminoácidos das apresentadas na Tabela 4 por um, dois, três ou mesmo mais aminoácidos no caso de CDR2 e CDR3.

Tabela 4: Denominação das sequências de proteínas das regiões CDR na Nomenclatura Kabat de regiões V_H e V_L de anticorpos beta-amiloide específicos.

Anticorpo	**Cadeia pesada variável**	**Cadeia leve variável**
NI-101.11		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 21)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)
NI-101.12F6A		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 21)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)

[0061] O anticorpo da presente invenção compreende a sequência de aminoácidos das regiões V_H e V_L do anticorpo NI-101.12F6A, tal como descrito nas Tabelas 2 e 3. Um fragmento de ligação a um antigénio do anticorpo poderá ser, por exemplo, um fragmento de cadeia simples Fv (scFv), um fragmento F(ab'), um fragmento F(ab), e um fragmento $F(ab')_2$. Para algumas aplicações são apenas necessárias as regiões variáveis dos anticorpos, que podem ser obtidas tratando o anticorpo com reagentes adequados de forma a gerar porções Fab', Fab, ou $F(ab'')_2$. Estes fragmentos são suficientes para utilização, por exemplo, em procedimentos de imunodiagnóstico envolvendo o acoplamento de porções de imunoglobulinas imunoespecíficas para detetar reagentes tais como radioisótopos.

[0062] A presente invenção é ainda direcionada para polipéptidos isolados que constituem os anticorpos da presente invenção. Os anticorpos da presente invenção compreendem polipéptidos, *e.g.*, sequências de aminoácidos codificantes para regiões de ligação ao antigénio específicas derivadas de moléculas de imunoglobulinas. Um polipéptido ou sequência de aminoácidos "derivada de" uma determinada proteína refere-se à origem do polipéptido contendo uma determinada sequência de aminoácidos. Em alguns casos, o polipéptido ou sequência de aminoácidos que é derivada de um polipéptido ou sequência de aminoácidos inicial particular tem uma sequência de aminoácidos que é essencialmente idêntica à da sequência inicial, ou a uma porção desta, em que a porção consiste em pelo menos 10-20 aminoácidos, pelo menos 20-30 aminoácidos, pelo menos 30-50 aminoácidos, ou que é de outra forma identificável por um perito na arte como tendo a sua origem na sequência inicial.

[0063] Uma imunoglobulina ou o seu cDNA codificante podem ainda ser modificados. Assim, numa outra forma de realização prática da presente invenção, o método da presente invenção compreende qualquer uma das etapas de produção de um anticorpo quimérico, anticorpo humanizado, anticorpo de cadeia simples, fragmento Fab, anticorpo biespecífico, anticorpo de fusão, anticorpo marcado ou um análogo de qualquer um destes. São conhecidos pelos peritos na arte os métodos correspondentes, encontrando-se estes descritos em, *e.g.*, Harlow e Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Quando são obtidos derivativos dos anticorpos referidos pela técnica de exibição em fagos, a ressonância plasmática de superfície tal como utilizada no sistema BIAcore pode ser utilizada para aumentar a eficiência dos anticorpos fágicos que se

ligam ao mesmo epitopo que qualquer um dos anticorpos aqui descritos (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). A produção de anticorpos quiméricos encontra-se descrita, por exemplo, no Pedido Internacional WO89/09622. Métodos para a produção de anticorpos humanizados encontram-se descritos, *e.g.*, no Pedido Europeu EP-A1 0 239 400 e no Pedido Internacional WO90/07861. Uma outra fonte de anticorpos, a serem utilizados de acordo com a presente invenção, são os designados anticorpos xenogénicos. O princípio geral para a produção de anticorpos xenogénicos, tais como anticorpos humanos em murganhos, é descrito nas, *e.g.*, Aplicações Internacionais WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 e WO 96/33735. Tal como acima discutido, o anticorpo da invenção poderá existir numa variedade de formas além de como anticorpo completo; incluindo, por exemplo, Fv, Fab, $F(ab)_2$, tal como em cadeias simples; ver, *e.g.*, o Pedido Internacional WO88/09344.

[0064] Os anticorpos da presente invenção, ou as cadeias de imunoglobulinas correspondentes, podem ainda ser modificadas utilizando técnicas convencionais conhecidas no estado da arte, por exemplo, através da utilização de remoções de aminoácidos, inserções, substituições, adições, e/ou recombinações, e/ou qualquer outro tipo de modificações conhecidas no estado da arte, quer isoladamente ou em combinação. Métodos para a introdução destas modificações na sequência de DNA subjacente à sequência de aminoácidos de uma cadeia de imunoglobulina são bem conhecidos pelos peritos na arte; ver, *e.g.*, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. e Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). As modificações do anticorpo da presente invenção incluem

derivatizações químicas e/ou enzimáticas em um ou mais dos aminoácidos constituintes, incluindo modificações das cadeias laterais, modificações do esqueleto da cadeia principal, modificações N- e C-terminais incluindo acetilação, hidroxilação, metilação, amidação, e a ligação a porções de carbohidratos ou lípidos, cofatores, e semelhantes. De igual forma, a presente invenção engloba a produção de proteínas quiméricas que compreendem o anticorpo descrito, ou algum fragmento deste, fundido no terminal amínico a uma molécula heteróloga tal como um ligando imunoestimulatório no terminal carboxílico; ver, *e.g.*, Pedido Internacional WO00/30680 para os detalhes técnicos correspondentes.

[0065] De acordo com o que foi acima referido, a presente invenção também se refere a um polinucleótido codificante para a molécula de ligação da presente invenção, no caso do anticorpo preferencialmente pelo menos uma região variável de uma cadeia de imunoglobulina do anticorpo acima descrito. Tipicamente, a referida região variável codificada pelo polinucleótido compreende pelo menos a região V_H e/ou V_L da região variável do referido anticorpo. Um perito na arte sabe que cada domínio variável (a região V_H da cadeia pesada e a região V_L da cadeia leve) de um anticorpo compreende três regiões de hipervariabilidade, por vezes designadas regiões determinantes de complementaridade ou "CDRs" flanqueadas por quatro regiões de estrutura relativamente conservadas ou "FRs" e referem-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo responsáveis pela ligação ao antigénio. As regiões de hipervariabilidade, ou CDRs, do subtipo IgG humano de anticorpos compreende os resíduos de aminoácidos a partir dos resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada tal como descrito

por Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991) e/ou os resíduos de um *loop* hipervariável, *e.g.*, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável da cadeia pesada, tal como descrito por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917. Os resíduos de estrutura *(Framework ou FR)* são os restantes resíduos do domínio variável que envolve as regiões hipervariáveis. O termo "liga-se especificamente" refere-se a um anticorpo que se liga a um antigénio pré-determinado. Tipicamente, o anticorpo liga-se com uma constante de dissociação (K_D) de 10^{-7} ou menor, e liga-se a um antigénio pré-determinado com uma K_D que é pelo menos duas vezes menor que a sua K_D de ligação a um antigénio inespecífico (*e.g.*, BSA, caseína, ou qualquer outro polipéptido especificado), diferente do antigénio pré-determinado. As frases "um anticorpo que reconhece um antigénio" e "um anticorpo específico para um antigénio" são aqui utilizadas indistintamente com o termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antigénio". Tal como aqui utilizado, uma ligação "altamente específica" significa que a K_D relativa do anticorpo para o epítopo alvo específico, *e.g.*, neo-epitopo, é pelo menos 10 vezes menor do que a K_D para a ligação daquele anticorpo a outros ligandos ou a contraparte nativa da proteína associada a uma doença.

[0066] A afinidade ou avidez de um anticorpo para um antigénio pode ser determinada experimentalmente utilizando qualquer método adequado; ver, por exemplo, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), e métodos aqui descritos. Técnicas

gerais para a medição da afinidade de um anticorpo para um antigénio incluem ELISA, RIA, e ressonância plasmónica de superfície. A afinidade medida de uma interação anticorpo-antigénio particular pode variar se medida em diferentes condições, *e.g.*, concentração salina, pH. Assim, medições de afinidade e outros parâmetros de ligação ao antigénio, *e.g.*, K_D, IC_{50}, são preferencialmente realizadas com soluções padronizadas de anticorpo e de antigénio, e um tampão padronizado.

[0067] Um perito na arte apreciará prontamente que o domínio variável do anticorpo, contendo o domínio variável acima descrito, pode ser utilizado para a construção de outros polipéptidos ou anticorpos da especificidade e função biológica desejada. Assim, a presente invenção também engloba polipéptidos e anticorpos compreendendo pelo menos uma região CDR dos domínios variáveis acima descritos e que tenha, vantajosamente, substancialmente as mesmas propriedades de ligação, ou propriedades de ligação semelhantes, às do anticorpo descrito nos exemplos anexos. Um perito na arte apreciará prontamente que a utilização dos domínios variáveis ou CDRs aqui descritos, podem ser construídos anticorpos de acordo com os métodos conhecidos no estado da arte, *e.g.*, tal como descrito nos Pedidos de Patente Europeus EP 0 451 216 A1 e EP 0 549 581 A1. Para além disso, um perito na arte sabe que a afinidade de ligação pode ser aumentada através da realização de substituições de aminoácidos no interior das regiões CDRs ou no interior dos *loops* hipervariáveis (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) que se sobrepõem parcialmente com as regiões CDRs tal como definidas por Kabat. Assim, a presente invenção também se refere a anticorpos em que uma ou mais das referidas regiões CDRs compreendem uma ou mais, preferencialmente não mais do que duas, substituições de

aminoácidos. Preferencialmente, o anticorpo da invenção compreende numa, ou em ambas das suas cadeias de imunoglobulina, duas ou todas as três regiões CDRs das regiões variáveis tal como apresentadas na Tabela 4.

[0068] Moléculas de ligação, *e.g.*, anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção, tal como conhecido pelos peritos na arte, podem conter uma região constante que medeia uma ou mais funções efetoras. Por exemplo, a ligação do componente C1 do complemento a uma região constante de um anticorpo pode ativar o sistema do complemento. A ativação do sistema do complemento é importante na opsonização e lise dos patógenos celulares. A ativação do complemento também estimula a resposta inflamatória e pode também estar envolvido na hipersensibilidade autoimune. Além disso, os anticorpos ligam-se a recetores em várias células através da região Fc, com um local de ligação a um recetor Fc na região de ligação a Fc do anticorpo a ligar-se a um recetor Fc (FcR) numa célula. Existe um número de recetores Fc que são específicos para diferentes classes de anticorpos, incluindo IgG (recetores gama), IgE (recetores epsilon), IgA (recetores alfa), e IgM (recetores mu). A ligação dos anticorpos ao recetor Fc nas superfícies celulares desencadeia uma série de respostas biológicas importantes e diversas, incluindo absorção e destruição de partículas revestidas por anticorpo, depuração de complexos imunes, lise de células alvo revestidas por anticorpos por células assassinas (designada citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo *(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)*, ou ADCC), libertação de mediadores inflamatórios, transferência placentária e controlo da produção de imunoglobulinas.

[0069] Consequentemente, algumas formas de realização práticas da presente invenção incluem um anticorpo, ou um fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste, em que pelo menos uma fração de um ou mais dos domínios de regiões constantes foi removida, ou de outra forma modificada, de forma a proporcionar as características bioquímicas desejadas tal como funções efetoras reduzidas, a capacidade de se dimerizar de forma não covalente, capacidade aumentada de se localizar no local de um tumor, tempo de semi-vida sérico reduzido, ou tempo de semi-vida aumentado comparativamente com um anticorpo completo e inalterado com aproximadamente a mesma imunogenicidade. Por exemplo, alguns anticorpos para utilização em métodos de diagnóstico e tratamento aqui descritos são anticorpos com domínios removidos que compreendem uma cadeia polipeptídica semelhante a uma cadeia pesada de imunoglobulina, mas que não possui pelo menos uma porção de um ou mais domínios de cadeia pesada. Por exemplo, em alguns anticorpos, um domínio inteiro da região constante do anticorpo modificado será removida, por exemplo, todo ou parte do domínio CH2 será removido. Noutras formas de realização práticas da presente invenção, alguns anticorpos para utilização em métodos de diagnóstico e tratamento aqui descritos têm uma região constante, *e.g.*, uma região constante de cadeia pesada IgG, que é alterada de forma a eliminar a glicosilação, referidos noutro local deste documento como anticorpos aglicosilados ou "agli". Estes anticorpos "agli" podem ser preparados enzimaticamente tal como por manipulação dos locais consenso de glicosilação na região constante. Embora não esteja vinculado pela teoria, pensa-se que os anticorpos "agli" podem ter um melhor perfil de segurança e estabilidade *in vivo*. Métodos de produção de anticorpos aglicosilados, tendo a função efetora desejada, são encontrados por exemplo no documento WO 2005/018572.

[0070] Em alguns anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, aqui descritos, a porção Fc pode ser mutada para diminuir a função efetora utilizando técnicas conhecidas no estado da arte. Por exemplo, a remoção ou inativação (através de mutações pontuais ou outros métodos) de um domínio de região constante pode reduzir a ligação a recetores Fc de um anticorpo modificado em circulação, desta forma aumentando a localização no tumor. Noutros casos, pode ocorrer que as modificações da região constante, consistentes com a presente invenção, moderem a ligação do complemento e assim reduzam o tempo de semi-vida sérico e a associação inespecífica de uma citotoxina conjugada. No entanto, poem ser utilizadas outras modificações da região constante para modificar ligações por pontes dissulfeto ou porções de oligossacáridos que permitam uma localização aumentada através da especificidade antigénica aumentada ou da flexibilidade do anticorpo. O perfil fisiológico resultante, biodisponibilidade e outros efeitos bioquímicos das modificações, tal como localização no tumor, biodistribuição e tempo de semi-vida sérico, podem facilmente ser medidos e quantificados utilizando técnicas imunológicas bem conhecidas sem experimentação indevida.

[0071] Formas modificadas de anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem ser preparados a partir de precursores completos ou anticorpos parentais utilizando técnicas conhecidas no estado da arte. Técnicas exemplificativas são discutidas aqui em maior detalhe.

[0072] Em certas formas de realização práticas da presente invenção, tanto as regiões variáveis como as regiões

constantes dos anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção, são completamente humanos. Anticorpos completamente humanos podem ser preparados utilizando técnicas que são conhecidas no estado da arte e aqui descritas. Por exemplo, anticorpos completamente humanos contra um antigénio especifico podem ser preparados através da administração do antigénio a um animal transgénico que tenha sido modificado para produzir tais anticorpos em resposta a um desafio antigénico, mas cujos locais endógenos tenham sido desativados. Técnicas exemplificativas que podem ser utilizadas para preparar estes anticorpos são descritas nos Pedidos de Patente E.U.A.: 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140. São conhecidas outras técnicas no estado da arte. Anticorpos completamente humanos podem igualmente ser produzidos por várias tecnologias de exibição, *e.g.*, exibição em fagos ou outros sistemas de exibição viral, tal como descrito noutro local deste documento em maior detalhe.

[0073] Anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem ser produzidos utilizando técnicas que são conhecidas no estado da arte. Em certas formas de realização práticas da presente invenção, moléculas de anticorpo, ou fragmentos destes, são "produzidos de forma recombinante", *i.e.*, são produzidos utilizando a tecnologia de DNA recombinante. Técnicas exemplificativas para a produção de moléculas de anticorpo, ou fragmentos destes, são discutidas noutro local deste documento em maior detalhe.

[0074] Anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem também incluir derivativos que são modificados, *e.g.*, pelo acoplamento covalente de qualquer tipo de molécula ao

anticorpo tal que o acoplamento covalente não previna o anticorpo de se ligar especificamente ao seu epítopo cognato. Por exemplo, mas não como exemplo limitativo, os derivativos do anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, *e.g.*, por glicosilação, acetilação, pegilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma de numerosas modificações químicas podem ser levadas a cabo por técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitadas a, clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, o derivativo pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

[0075] Em certas formas de realização práticas da presente invenção, anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção não elicitarão uma resposta imunitária prejudicial no animal a ser tratado, *e.g.*, num humano. Em certas formas de realização práticas da presente invenção, moléculas de ligação, *e.g.*, anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio destes, da invenção são derivados a partir de um paciente, *e.g.*, um paciente humano, e são subsequentemente utilizados na mesma espécie a partir da qual foram derivados, *e.g.*, humano, aliviando ou minimizando assim a ocorrência de respostas imunitárias prejudiciais.

[0076] A desimunização também pode ser utilizada para diminuir a imunogeneicidade de um anticorpo. Tal como aqui utilizado, o termo "desimunização" inclui alterações de um anticorpo para modificar os epítopos de células T (ver, *e.g.*, documentos WO9852976A1, WO0034317A2). Por exemplo, sequências VH e VL de um anticorpo inicial são analisadas e é obtido um "mapa" de um epítopo humano de célula T de cada

uma das regiões V demonstrando a localização dos epítopos em relação às regiões determinantes de complementaridade (CDRs) e outros resíduos chave no interior da sequência. Epítopos individuais de células T do mapa de epítopo de células T são analisados por forma a identificar substituições de aminoácidos alternativas com um baixo risco de alterarem a atividade do anticorpo final. Uma variedade de sequências VH e VL alternativas são desenhadas compreendendo combinações de substituições de aminoácidos e estas sequências são subsequentemente incorporadas numa variedade de polipéptidos de ligação, *e.g.*, anticorpos neo-epítopo específico, ou fragmentos imunoespecíficos destes, para utilização nos métodos de diagnóstico e tratamento aqui divulgados, que são depois testados para a função. Tipicamente, entre 12 a 24 variantes de anticorpo são geradas e testadas. Genes de cadeia pesada e leve completos compreendendo regiões V modificadas e C humanas são depois clonados em vetores de expressão e os plasmídeos subsequentes introduzidos em linhas celulares para a produção do anticorpo completo. Os anticorpos são depois comparados em ensaios bioquímicos e biológicos apropriados, sendo identificada a variante otimizada.

[0077] Anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando uma grande variedade de técnicas conhecidas no estado da arte, incluindo a utilização de hibridomas, tecnologias de DNA recombinante ou exibição em fagos, ou uma combinação destas. Por exemplo, anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando técnicas de hibridomas incluindo as conhecidas no estado da arte e ensinadas, por exemplo, em Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling *et al.*, em: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). O termo "anticorpo monoclonal", tal

como aqui utilizado, não se encontra limitado aos anticorpos produzidos através da tecnologia de hibridomas. O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que é derivado de um único clone, incluindo qualquer clone eucariótico, procariótico, ou fágico, e não o método pelo qual o anticorpo é produzido. Assim, o termo "anticorpo monoclonal" não se encontra limitado a anticorpos produzidos através da tecnologia de hibridomas. Anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando uma grande variedade de técnicas conhecidas no estado da arte. Em determinadas formas de realização práticas da presente invenção, os anticorpos da presente invenção são derivados de célula B humanas que foram imortalizadas através da transformação com o vírus Epstein-Barr, tal como aqui descrito.

[0078] No bem conhecido processo de hibridomas (Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975)), os linfócitos de vida relativamente curta, ou mortais, de um mamífero, *e.g.*, células B derivadas de um sujeito humano tal como aqui descrito, são fundidas com uma linha celular tumoral imortal (*e.g.*, uma linha celular de mieloma), produzindo assim células híbridas, ou "hibridomas" que são imortais e capazes de produzir o anticorpo geneticamente codificado da célula B. Os híbridos resultantes são separados em estirpes genéticas únicas por seleção, diluição, e crescimento, sendo que cada estirpe individual compreende genes específicos para a formação de um único anticorpo. Estes produzem anticorpos, que são homogéneos contra um antigénio desejado e, em referência á sua paternidade genética pura, são designados "monoclonais".

[0079] Células de hibridoma assim preparadas são semeadas e cultivadas num meio de cultura apropriado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o

crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Os peritos na arte apreciarão que os reagentes, linhas celulares e meios para a formação, seleção e crescimento dos hibridomas se encontram comercialmente disponíveis a partir de uma variedade de fornecedores, havendo protocolos padronizados bem estabelecidos. Geralmente, o meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas é avaliado para a produção de anticorpos monoclonais contra o antigénio desejado. A especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por ensaios *in vitro* tais como imunoprecipitação, radioimunoensaio *(radioimmunoassay (RIA))* ou Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzimas (ELISA) *(enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA))*, ou ensaios de ligação a neo-epitopos tal como aqui descrito. Após as células de hibridoma produtoras de anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejada, serem identificadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e cultivados por métodos padrão (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp 59-103 (1986)). Será ainda apreciado que os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones podem ser separados do meio de cultura, fluído de ascites ou soro, por métodos de purificação convencionais, tais como, por exemplo, proteína-A, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

[0080] Fragmentos de anticorpos que reconhecem especificamente epítopos podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, fragmentos Fab e $F(ab')_2$ podem ser produzidos de forma recombinante ou por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulinas, utilizando enzimas tais como a papaína (para produzir fragmentos Fab)

ou pepsina (para produzir fragmentos $F(ab')_2$). Os fragmentos $F(ab')_2$ contêm a região variável, a região constante de cadeia leve e o domínio CH1 da cadeia pesada.

[0081] Anticorpos completamente humanos, tais como os aqui descritos, são particularmente desejáveis para o tratamento terapêutico de pacientes humanos. Anticorpos humanos podem ser preparados por uma variedade de métodos conhecidos no estado da arte, incluindo os métodos de exibição em fagos acima descritos, utilizando bibliotecas de anticorpos derivadas de sequências de imunoglobulinas humanas. Ver também, Pedido de Patente E.U.A. Nos. 4,444,887 e 4,716,111; e Pedidos PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, e WO 91/10741. Os anticorpos humanos da presente invenção são isolados, *e.g.*, a partir de pacientes livres de sintomas mas afetados pelo risco de poderem contrair a doença, *e.g.*, doença de Alzheimer, ou um paciente com a doença, mas com uma evolução da doença invulgarmente estável.

[0082] Noutra forma de realização prática da presente invenção, o DNA codificante para os anticorpos monoclonais desejados pode ser prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (*e.g.*, através da utilização de sondas de oligonucleótidos capazes de se ligar especificamente a genes codificantes para as cadeias pesadas e leves dos anticorpos murinos). As células de hibridoma isoladas e subclonadas servem como fonte preferencial de um tal DNA. Após ser isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são depois transferidos para células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, tais como, mas não se limitando a, células de *E. coli*, células símias COS, células de Ovário de Hamster Chinês *(Chinese Hamster Ovary (CHO))*, ou células de mieloma que não produzem, de outra

forma, imunoglobulinas. Mais particularmente, o DNA isolado (que pode ser sintético, tal como aqui descrito), pode ser utilizado para clonar sequências das regiões variáveis e constantes para a produção de anticorpos tal como descrito em Newman *et al.*, Pedido de Patente E.U.A. No. 5,658,570, submetido em 25 de Janeiro de 1995. Essencialmente, isto implica a extração de RNA a partir das células selecionadas, conversão para cDNA, e amplificação por PCR utilizando *primers* específicos de Ig. *Primers* adequados para este propósito são também descritos no Pedido de Patente E.U.A. No. 5,658,570. Tal como será discutido em maior detalhe posteriormente, as células transformadas expressoras do anticorpo desejado podem ser cultivadas em quantidade relativamente grandes para proporcionar abastecimentos de imunoglobulinas clínicos e comerciais.

[0083] Numa forma de realização prática da presente invenção, a sequência de aminoácidos dos domínios variáveis da cadeia pesada e/ou leve podem ser inspecionados para identificar as sequências das regiões determinantes de complementaridade (CDRs), por métodos que são bem conhecidos no estado da arte, *e.g.*, por comparação com sequências de aminoácidos conhecidas de outras regiões variáveis de cadeias pesadas e leves, para determinar as regiões de sequência hipervariável. Utilizando técnicas rotineiras de DNA recombinante, uma ou mais regiões CDRs podem ser inseridas no interior de regiões de estrutura *(framework)*, *e.g.*, em regiões de estrutura humanas. As regiões de estrutura podem ser naturalmente ocorrentes ou regiões de estrutura consenso, e preferencialmente regiões de estrutura humanas (ver, *e.g.*, Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998) para uma listagem de regiões de estrutura humanas). Em determinadas formas de realização práticas da presente invenção, o polinucleótido criado pela combinação das

regiões de estrutura e as regiões CDRs codifica um anticorpo que se liga especificamente a pelo menos um epítopo de um polipéptido desejado. Em certas formas de realização práticas da presente invenção, uma ou mais substituições de aminoácidos pode ser feita no interior das regiões de estrutura, para, *e.g.*, melhorar a ligação do anticorpo ao seu antigénio. Adicionalmente, estes métodos podem ser utilizados para fazer substituições ou remoções de aminoácidos de um ou mais resíduos de cisteína da região variável, participantes numa ponte dissulfeto inter-cadeia, para criar moléculas de anticorpo sem uma ou mais pontes dissulfeto inter-cadeia. Outras alterações ao polinucleótido são englobadas pela presente invenção e encontram-se ao alcance de um perito na arte.

[0084] Alternativamente, as técnicas de produção de cadeias simples de anticorpos descritas (Pedido de Patente E.U.A. No. 4,694,778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); e Ward *et al.*, Nature 334:544-554 (1989)), podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia simples. Os anticorpos de cadeia simples são formados pela ligação de fragmentos de cadeia pesada e leve da região Fv, através de uma ponte de aminoácidos, resultando numa única cadeia de anticorpo. Técnicas para a construção de fragmentos Fv funcionais em *E. coli* podem também ser utilizadas (Skerra et *al.*, Science 242:1038-1041 (1988)).

[0085] Noutra forma de realização prática da presente invenção, podem ser selecionados linfócitos por micro-manipulação e isolados os genes variáveis. Por exemplo, células mononucleares do sangue periférico podem ser isoladas a partir de um mamífero imunizado ou naturalmente imune, *e.g.*, um humano, e cultivadas durante cerca de 7 dias

in vitro. As culturas podem ser rastreadas para IgGs específicas que cumpram os critérios do rastreio. As células de poços positivos podem ser isoladas. Células B individuais produtoras de Ig podem ser isoladas por FACS ou pela sua identificação em ensaios de placas hemolíticas mediadas pelo sistema do complemento. As células B individuais produtoras de Ig podem ser micro-manipuladas num tubo e os genes VH e VL podem ser amplificados utilizando, *e.g.*, RT-PCR. Os genes VH e VL podem ser clonados num vetor de expressão de anticorpos e transfectados para células (*e.g.*, células eucarióticas ou procarióticas) para expressão.

[0086] Alternativamente, linhas celulares produtoras de anticorpos podem ser selecionadas e cultivadas utilizando técnicas bem conhecidas de um perito na arte. Estas técnicas são descritas numa variedade de manuais de laboratório e publicações principais. A este respeito, técnicas adequadas para utilização na invenção, tal como abaixo descrito, encontram-se descritas em Current Protocols in Immunology, Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991).

[0087] Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos por qualquer método conhecido no estado da arte para a síntese de anticorpos, em particular, por síntese química ou, preferencialmente, por técnicas de expressão recombinante tal como aqui descrito.

[0088] Numa forma de realização prática da presente invenção, um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste, da invenção compreende uma região constante sintética em que um ou mais domínios são parcialmente ou completamente removidos ("anticorpos de domínio removido"). Em determinadas formas de realização

práticas da presente invenção, anticorpos compatíveis modificados compreendem construtos com domínios removidos ou variantes em que o domínio CH2 completo foi removido (construtos ΔCH2). Para outras formas de realização práticas da presente invenção, um pequeno péptido de conexão pode ser substituído pelo domínio removido para fornecer flexibilidade e liberdade de movimento à região variável. Os peritos na arte serão capazes de reconhecer que estes construtos são particularmente preferíveis devido às propriedades regulatórias do domínio CH2 na taxa catabólica do anticorpo. Os construtos de domínio removido podem ser derivados utilizando um vetor codificante para um domínio constante de IgG_1 humano (ver, *e.g.*, documentos WO 02/060955A2 e WO02/096948A2). Este vetor é manipulado de forma a remover o domínio CH2 e fornece assim um vetor sintético que expressa uma região constante IgG_1 de domínio removido.

[0089] Em determinadas formas de realização práticas da presente invenção, anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção são minicorpos. Os minicorpos podem ser preparados utilizando métodos descritos no estado da arte (ver, *e.g.*, Pedido de Patente E.U.A. 5,837,821 ou o documento WO 94/09817A1).

[0090] Em determinadas formas de realização práticas da presente invenção, anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção compreendem uma cadeia pesada de imunoglobulina contendo remoções ou substituições de alguns, ou mesmo um único, aminoácido, desde que estas permitam a associação entre as subunidades monoméricas. Por exemplo, a mutação de um único aminoácido em áreas selecionadas do domínio CH2 pode ser suficiente para reduzir substancialmente a ligação Fc e,

desta forma, aumentar a localização no tumor. De igual forma, poderá ser simplesmente desejável remover parte de um ou mais domínios de regiões constantes que controlam a função efetora (*e.g.*, ligação ao complemento) para que esta seja modulada. Estas remoções parciais das regiões constantes podem melhorar as características escolhidas do anticorpo (tempo de semi-vida sérico), deixando ao mesmo tempo outras funções desejáveis associadas com o domínio de região constante do sujeito intacto. Para além disso, como acima aludido, as regiões constantes dos anticorpos divulgados pode ser sintética através da mutação ou substituição de um ou mais aminoácidos que melhore o perfil do construto resultante. A este respeito, pode ser possível desfazer a atividade fornecida por um local de ligação conservado (*e.g.*, ligação a Fc), mantendo ao mesmo tempo a configuração e o perfil imunogénico do anticorpo modificado. Ainda outras formas de realização práticas da presente invenção compreendem a adição de um ou mais aminoácidos à região constante para melhorar características desejáveis, tais como a função efetora, ou fornecer um maior acoplamento de citotoxina ou carbohidrato. Nestas formas de realização práticas da presente invenção poderá ser desejável a inserção ou replicação de sequências específicas derivadas a partir de domínios de regiões constantes selecionados.

[0091] A presente invenção também fornece anticorpos que compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem em, variantes (incluindo derivativos) de moléculas de anticorpo (*e.g.*, as regiões VH e/ou regiões VL) aqui descritas, cujos anticorpos, ou fragmentos destes, se ligam imunoespecificamente a uma polipéptido associado a uma doença, ou fragmento ou derivado deste. Técnicas padrão conhecidas pelos peritos na arte podem ser utilizadas para introduzir mutações na sequência de nucleótidos codificante

para um anticorpo, incluindo, mas não se limitando a, mutagênese dirigida e mutagênese mediada por PCR, que resultam em substituições de aminoácidos. Preferencialmente, as variantes (incluindo derivativos) codificam menos do que 50 substituições de aminoácidos, menos do que 40 substituições de aminoácidos, menos do que 30 substituições de aminoácidos, menos do que 25 substituições de aminoácidos, menos do que 20 substituições de aminoácidos, menos do que 15 substituições de aminoácidos, menos do que 10 substituições de aminoácidos, menos do que 5 substituições de aminoácidos, menos do que 4 substituições de aminoácidos, menos do que 3 substituições de aminoácidos ou menos do que 2 substituições de aminoácidos relativamente a uma região VH de referência, VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, região VL, VL-CDR1, VL-CDR2, ou VL-CDR3. Uma "substituição de aminoácidos conservativa" é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido contendo uma cadeia lateral com uma carga semelhante. Famílias de resíduos de aminoácidos contendo cadeias laterais com cargas semelhantes foram definidas no estado da arte. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (*e.g.*, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (*e.g.*, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais não carregadas polares (*e.g.*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais apolares (*e.g.*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (*e.g.*, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (*e.g.*, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, podem ser introduzidas mutações aleatoriamente ao longo de, ou em parte, da sequência codificante, tal como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser rastreados para a atividade biológica para identificar mutantes que

retenham atividade (*e.g.*, a capacidade de se ligar ao polipéptido associado a uma doença).

[0092] Por exemplo, é possível introduzir mutações apenas nas regiões de estrutura *(framework)* ou apenas em regiões CDR de uma molécula de anticorpo. As mutações introduzidas podem ser silenciosas ou mutações neutras *missense*, *e.g.*, não tendo, ou tendo pouco, efeito na capacidade do anticorpo para se ligar a um antigénio, sendo que algumas mutações não alteram a sequência de aminoácidos. Estes tipos de mutações podem ser úteis na otimização da utilização de codões, ou na melhoria da produção de anticorpos de um hibridoma. Regiões de codificação otimizadas de codões codificantes para anticorpos da presente invenção são aqui divulgadas noutro local. Alternativamente, mutações não neutras *missense* podem alterar a capacidade de um anticorpo em se ligar ao antigénio. A localização da maioria das mutações silenciosas e neutras *missense* é provavelmente nas regiões de estrutura, enquanto que a localização da maioria das mutações não neutras *missense* é provavelmente em regiões CDR, apesar de isto não ser um requerimento absoluto. Um perito na arte será capaz de desenhar e testar moléculas mutantes com as propriedades desejadas tais como nenhuma alteração na atividade de ligação ao antigénio, ou alteração na atividade de ligação (*e.g.*, melhorias na atividade de ligação ao antigénio ou alterações na especificidade do anticorpo). Após mutagénese, a proteína codificada pode ser rotineiramente expressa e a atividade funcional e/ou biológica da proteína codificada (e.g., capacidade de se ligar imunoespecificamente a pelo menos um epítopo de um polipéptido associado a uma doença) pode ser determinada utilizando técnicas descritas aqui ou por rotineiramente modificar técnicas conhecidas no estado da arte.

IV. Polinucleótidos Codificantes de Anticorpos

[0093] De acordo com o que foi acima exposto, a presente invenção também se refere a um polinucleótido codificante para uma molécula de ligação da presente invenção, *e.g.*, um anticorpo. No caso do anticorpo, o polinucleótido pode codificar pelo menos uma região variável de uma cadeia de imunoglobulina do anticorpo acima descrito. O polinucleótido da invenção codificante para o anticorpo acima descrito pode ser, *e.g.*, DNA, cDNA, RNA, ou DNA ou RNA sinteticamente produzido, ou uma molécula quimérica de ácidos nucleicos produzidos de forma recombinante, compreendendo qualquer um dos polinucleótidos isoladamente ou em combinação. Preferencialmente, o referido polinucleótido é parte de um vetor. Estes vetores podem compreender outros genes tais como genes marcadores que permitam a seleção do referido vetor numa célula hospedeira adequada em condições adequadas. Preferencialmente, o polinucleótido da invenção encontra-se operativamente ligado a sequências de controlo de expressão, permitindo a expressão em células procarióticas ou eucarióticas. A expressão do referido polinucleótido compreende a transcrição do polinucleótido para um mRNA tradutível. Elementos reguladores que garantem a expressão em células eucarióticas, preferencialmente células de mamífero, são bem conhecidos dos peritos na arte. Estes elementos reguladores compreendem normalmente sequências regulatórias que garantem a iniciação da transcrição e, opcionalmente, sinais poli-A que garantem a terminação da transcrição e estabilização do transcrito. Elementos reguladores adicionais podem incluir potenciadores de transcrição ou tradução, e/ou regiões promotoras naturalmente associadas ou heterólogas.

[0094] Um polinucleótido codificante para um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste, pode ser composto por qualquer poliribonucleótido ou polidesoxiribonucleótido, que pode ser RNA ou DNA não modificado, ou RNA ou DNA modificado. Por exemplo, um polinucleótido codificante para um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste, pode ser composto de DNA de cadeia simples ou dupla, DNA que é uma mistura de regiões de cadeia simples e dupla, RNA de cadeia simples e dupla, e RNA que é uma mistura de regiões de cadeia simples e dupla, moléculas híbridas contendo DNA e RNA que podem ser de cadeia simples ou, mais tipicamente, cadeia dupla ou uma mistura de regiões de cadeia simples e dupla. Adicionalmente, um polinucleótido codificante para um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste pode ser constituído por regiões de cadeia tripla compreendendo RNA ou DNA, ou tanto RNA como DNA. Um polinucleótido codificante para um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste pode também conter uma ou mais bases modificadas ou esqueletos de DNA ou RNA modificados para a estabilidade ou por outras razões. As bases "modificadas" incluem, por exemplo, bases tritiladas e bases incomuns tais como inosina. Podem ser efetuadas uma variedade de modificações a DNA e RNA; assim, "polinucleótido" engloba formas modificadas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente.

[0095] Um polinucleótido isolado codificante para uma variante não natural de um polipéptido derivado de uma imunoglobulina (*e.g.*, porção de cadeia pesada ou porção de cadeia leve de uma imunoglobulina) pode ser criado através da introdução de uma ou mais substituições, adições ou remoções de nucleótidos na sequência de nucleótidos da imunoglobulina tal que uma ou mais substituições, adições ou

remoções de aminoácidos sejam introduzidas na proteína codificada. As mutações podem ser introduzidas por técnicas padrão, tal como mutagénese dirigida e mutagénese mediada por PCR. São preferencialmente realizadas substituições de aminoácidos em um ou mais resíduos não essenciais de aminoácidos.

[0096] Tal como é bem conhecido, RNA pode ser isolado a partir de células originais de hibridoma, ou de outras células transformadas, por técnicas padrão, tal como extração com isotiocianato de guanidínio e precipitação seguida de centrifugação ou cromatografia. Quando desejável, o mRNA pode ser isolado a partir de RNA total por técnicas padrão tais como cromatografia em celulose oligo dT. São conhecidas técnicas adequadas no estado da arte.

[0097] Numa forma de realização prática da presente invenção, os cDNAs que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo podem ser gerados, simultaneamente ou separadamente, utilizando a transcriptase reversa e a DNA polimerase de acordo com métodos bem conhecidos. A reação de PCR pode ser iniciada por *primers* consenso de uma região constante ou por *primers* mais específicos baseados em sequências de DNA e aminoácidos publicadas de cadeias pesadas e leves. Tal como acima discutido, as reações de PCR podem também ser utilizadas para isolar clones de DNA codificantes para cadeias leves e pesadas. Neste caso, podem ser rastreadas bibliotecas com *primers* consenso ou sondas homólogas maiores, tais como sondas da região constante de murganho.

[0098] DNA, tipicamente DNA plasmídico, pode ser isolado a partir das células utilizando técnicas conhecidas no estado da arte, mapeado por restrição e sequenciado de acordo com técnicas padrão bem conhecidas apresentadas em detalhe,

e.g., nas referências acima mencionadas relacionadas com técnicas de DNA recombinante. É óbvio que o DNA pode ser sintético de acordo com a presente invenção em qualquer etapa do processo de isolamento ou análise subsequente.

[0099] A presente invenção fornece um polinucleótido isolado compreendendo, composto essencialmente por, ou composto por um ácido nucleico codificante para uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina (VL), contendo as sequências polipeptídicas VL-CDR1, VL-CDR2, ou VL-CDR3, apresentadas na Tabela 4.

[0100] A presente invenção fornece um polinucleótido isolado compreendendo, composto essencialmente por, ou composto por um ácido nucleico codificante para uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (VH), em que as regiões VH-CDR1, VH-CDR2, ou VH-CDR3, contêm sequências de polipéptidos que são idênticas aos grupos VH-CDR1, VH-CDR2, e VH-CDR3 apresentados na Tabela 4.

Tabela 5: Sequências dos polinucleótidos das regiões V_H dos anticorpos Abeta específicos

Anticorpo	Sequência da cadeia pesada variável
NI-101.11 (SEQ ID NO:56)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGG CATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA GTTATATGGTTTGATGGAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTGAAGG GCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCA AATGAACACTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA GATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGGGCCGTACTACATGGACGTCTGGG GCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.11 (SEQ ID NO:5) (otimizada de codões)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCGGGCGGA GCCTGCGGCTGGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGCCTTCAGCAGCTACG GCATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCC GTGATCTGGTTCGACGGCACCAAGAAGTACTACACCGACAGCGTGAAG GGCCGGTCAACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACACCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GGACCGGGGCATCGGCGCCCGCGCGGGCCCCTACTACATGGACGTGTGG GGCAAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
NI-101.12F 6A (SEQ ID NO:38)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGG CATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA GTTATATGGTTTGATGGAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTGAAGG GCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCA AATGAACACCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA GATAGGGGTATAGCAGCTCGGCGGGGGCCGTACTACATGGACGTCTGGG GCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Tabela 6: Sequências dos polinucleótidos das regiões V_L dos anticorpos Abeta específicos

Anticorpo	Sequência da cadeia leve variável (kappa ou lambda)
NI-101.11 (SEQ ID NO:7)	GAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA CAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAA ATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTGTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTCGGCGGA GGGACCAAGCTCGAGATCAAACGTACG
NI-101.12F 6A (SEQ ID NO:40)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA CAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAA ATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTGTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTCGGCGGA GGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT

[0101] A este respeito, um perito na arte apreciará prontamente que polinucleótidos codificantes para pelo menos um domínio variável da cadeia leve e/ou pesada podem codificar os domínios variáveis de ambas as cadeias de imunoglobulina ou apenas uma. De igual forma, os referidos polinucleótidos podem encontrar-se sob o controlo do mesmo promotor, ou podem ser controlados separadamente para expressão. Possíveis elementos reguladores que permitem a expressão em células hospedeiras procarióticas incluem, *e.g.*, os promotores P_L, lac, trp ou tac em *E. coli*, sendo exemplos de elementos reguladores que permitem a expressão em células hospedeiras eucarióticas os promotores AOX1 ou GAL1 em levedura, ou os promotores CMV-, SV40- e RSV-, potenciador CMV, potenciador SV40 ou intrão globina em mamíferos e outros animais. Para além dos elementos responsáveis pela iniciação da transcrição, estes elementos reguladores podem também conter sinais de terminação da transcrição, tais como o local SV40-poliA ou o local tk-poliA, a jusante do polinucleótido. Para além disso, dependendo do sistema de expressão utilizado, podem ser adicionadas à sequência codificante do polinucleótido da invenção sequências líder, bem conhecidas no estado da arte, capazes de direcionar o polipéptido para um compartimento celular ou a sua secreção para o meio. A(s) sequência(s) líder(es) é(são) colocada(s) na fase apropriada com sequências de tradução, iniciação ou terminação, e preferencialmente, uma sequência líder capaz de direcionar a secreção da proteína traduzida, ou uma porção desta, para o espaço periplasmático ou meio extracelular. Opcionalmente, a sequência heteróloga pode codificar uma proteína de fusão incluindo um péptido de identificação C- ou N-terminal que transmita características desejadas, *e.g.*, tal como a estabilização ou purificação simplificada de produtos recombinantes expressos. Neste contexto, são conhecidos no

estado da arte vetores de expressão adequados, tais como o vetor de expressão de cDNA Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), ou pSPORT1 (GIBCO BRL). Preferencialmente, as sequências de controlo de expressão serão sistemas promotores eucarióticos em vetores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas, embora também possam ser utilizadas sequências para hospedeiros procarióticos. Depois de o vetor ter sido incorporado num hospedeiro apropriado, o hospedeiro é mantido em condições adequadas a um elevado nível de expressão das sequências de nucleótidos, podendo seguir-se, tal como desejado, a recolha e purificação das cadeias de imunoglobulinas leves, pesadas, dímeros de cadeias leves/pesadas ou anticorpos intactos, fragmentos de ligação ou outras formas de imunoglobulinas; ver, Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979).

[0102] A presente invenção também inclui fragmentos dos polinucleótidos da invenção, tal como descrito noutro local deste documento. Polinucleótidos adicionais que codificam polinucleótidos de fusão, fragmentos Fab, e outros derivativos, tal como aqui descrito, são também contemplados pela invenção.

[0103] Os polinucleótidos podem ser preparados ou produzidos por qualquer método conhecido no estado da arte. Por exemplo, se a sequência de nucleótidos do anticorpo é conhecida, pode ser criado um polinucleótido codificante para o anticorpo a partir de oligonucleótidos sintetizados quimicamente (*e.g.*, tal como descrito em Kutmeier *et al.*, BioTechniques 17:242 (1994)), que, de forma breve, envolve a síntese de oligonucleótidos que se sobrepõem contendo porções da sequência codificante para o anticorpo, a hibridação e a

ligação destes oligonucleótidos, e a amplificação dos oligonucleótidos ligados por PCR.

[0104] Alternativamente, um polinucleótido codificante para um anticorpo, ou um fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste, pode ser gerado a partir de ácidos nucleicos de uma fonte apropriada. Se não houver disponível um clone contendo um ácido nucleico codificante para um anticorpo particular, mas for conhecida a sequência da molécula de anticorpo, pode ser sintetizado quimicamente um ácido nucleico codificante para o anticorpo ou ser obtido um ácido nucleico codificante para o anticorpo a partir de uma fonte apropriada (e.g., uma biblioteca de cDNA de anticorpos, ou uma biblioteca de cDNA criada a partir de ácidos nucleicos, preferencialmente poli A+RNA, isolado de qualquer tecido ou células expressoras do anticorpo especifico para o neo-antigénio, tais como células de hibridoma selecionadas para expressar o anticorpo) por amplificação por PCR utilizando *primers* sintéticos hibridáveis com as extremidades 3´ e 5´ da sequência, ou por clonagem utilizando uma sonda de oligonucleótidos especifica para a sequência génica particular para identificar, e.g., um clone de cDNA de uma biblioteca de cDNA que codifica o anticorpo. Os ácidos nucleicos amplificados gerados por PCR podem depois ser clonados em vetores de clonagem replicáveis utilizando qualquer método bem conhecido no estado da arte.

[0105] Depois de ser determinada a sequência de nucleótidos, e correspondente sequência de aminoácidos, do anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste, a sua sequência de nucleótidos pode ser manipulada utilizando métodos bem conhecidos no estado da arte para a manipulação de sequências nucleotídicas, e.g., técnicas de DNA recombinante, mutagénese dirigida, PCR, etc. (ver, por

exemplo, as técnicas descritas em Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) e Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1998) para gerar anticorpos contendo sequências de aminoácidos diferentes, por exemplo para criar substituições, remoções, e/ou inserções de aminoácidos.

V. Expressão de Polipéptidos de Anticorpos

[0106] A presente invenção também envolve um método de produção de células capazes de expressar um anticorpo da invenção ou a(s) sua(s) cadeia(s) de imunoglobulina correspondente(s), compreendendo células geneticamente modificadas com o polinucleótido ou com o vetor da invenção. As células obtidas com o método descrito na invenção podem ser utilizadas, por exemplo, para testar a interação do anticorpo da invenção com o seu antigénio.

[0107] Após a manipulação do material genético isolado para fornecer anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes da invenção, os polinucleótidos codificantes para os anticorpos são tipicamente inseridos num vetor de expressão para introdução em células hospedeiras que possam ser utilizadas para produzir a quantidade desejada de anticorpo.

[0108] Expressão recombinante de um anticorpo, ou fragmento, derivativo ou análogo deste, *e.g.*, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo que se liga a uma molécula alvo aqui descrita. Após ter sido obtido um polinucleótido codificante para uma molécula de anticorpo ou uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou porção deste (preferencialmente contendo o domínio variável de cadeia pesada ou leve), o vetor para

a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido através de tecnologia de DNA recombinante utilizando técnicas bem conhecidas no estado da arte. Assim, métodos de preparação de uma proteína por expressão de um polinucleótido contendo uma sequência de nucleótidos codificante para um anticorpo são aqui descritos. Os métodos bem conhecidos dos peritos na arte podem ser utilizados para construir vetores de expressão contendo sequências codificantes para anticorpos e sinais de transorição e tradução apropriados. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas *in vitro* de DNA recombinante, técnicas de síntese, e recombinação genética *in vivo*. Desta forma, a invenção fornece vetores replicáveis contendo uma sequência de nucleótidos codificante para uma molécula de anticorpo da invenção, ou uma cadeia pesada ou leve desta, ou um domínio variável de cadeia pesada ou leve, operativamente ligado a um promotor. Estes vetores podem incluir a sequência de nucleótidos codificante para a região constante da molécula de anticorpo (ver, e.g., Pedido de Publicação PCT WO 86/05807; Pedido de Publicação PCT WO 89/01036; e Pedido de Patente E.U.A. No. 5,122,464), podendo o domínio variável do anticorpo ser clonado num tal vetor para a expressão completa da cadeia pesada ou leve.

[0109] A presente invenção refere-se a vetores, particularmente plasmídeos, cosmídeos, vírus e bacteriófagos utilizados convencionalmente em engenharia genética que contêm um polinucleótido codificante para o antigénio, ou preferencialmente um domínio variável de uma cadeia de imunoglobulina de um anticorpo da invenção; opcionalmente em combinação com um polinucleótido da invenção que codifica o domínio variável de outra cadeia de imunoglobulina do anticorpo da invenção. Preferencialmente, o referido vetor é um vetor de expressão e/ou de transferência de genes ou de direcionamento. Vetores de expressão derivados de vírus,

tais como retrovírus, vírus vaccinia, vírus adeno-associado, vírus do herpes ou vírus do papiloma bovino, podem ser utilizados para a entrega de polinucleótidos ou vetor da invenção numa população celular alvo. Os métodos bem conhecidos pelos peritos na arte podem ser utilizados para construir vetores virais recombinantes; ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. e Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternativamente, os polinucleótidos e vetores da invenção podem ser reconstituídos em lipossomas para entrega nas células alvo. Os vetores contendo os polinucleótidos da invenção (*e.g.*, o(s) domínio(s) pesado e/ou leve das sequências codificantes das cadeias de imunoglobulina e sequências de controlo de expressão) podem ser transferidas para a células hospedeira por métodos bem conhecidos, que variam dependendo do tipo de hospedeiro celular. Por exemplo, a transfecção com cloreto de cálcio é comummente utilizada para células procarióticas, enquanto que o tratamento com fosfato de cálcio ou a técnica de electroporação podem ser utilizados para outros hospedeiros celulares; ver Sambrook, *supra*.

[0110] O termo "vetor" ou "vetor de expressão" é aqui utilizado para se referir a vetores utilizados de acordo com a presente invenção como veículos de introdução e expressão de um gene particular numa célula hospedeira. Tal como é conhecido dos peritos na arte, estes vetores podem facilmente ser selecionados a partir de um grupo constituído por plasmídeos, fagos, vírus e retrovírus. No geral, os vetores compatíveis com a presente invenção compreenderão um marcador de seleção, locais de restrição apropriados para facilitar a clonagem do gene desejado e a capacidade de se

introduzirem e/ou replicarem em células eucarióticas ou procarióticas.

[0111] Para os propósitos desta invenção, podem ser utilizados vários sistemas de vetores de expressão. Por exemplo, uma classe de vetores utiliza elementos de DNA que são derivados de vírus animais tais como o vírus do papiloma bovino Vírus, vírus de poliома, adenovírus, vírus vaccinia, baculovírus, retrovíros (RSV, MMTV ou MOMLV) ou vírus SV40. Outros envolvem a utilização de sistemas policistrónicos com locais internos de ligação ao ribossoma. Adicionalmente, células que integraram o DNA nos seus cromossomas podem ser selecionadas através da introdução de um ou mais marcadores que permitem a seleção de células hospedeiras transfectadas. O marcador pode fornecer uma prototrofia a um hospedeiro auxotrófico, resistência a um biocida (e.g., antibióticos) ou resistência a metais pesados como o cobre. Os genes dos marcadores de seleção podem ser diretamente ligados às sequências de DNA a serem expressas, ou introduzidos na mesma célula por co-transformação. Podem ser necessários elementos adicionais para a síntese otimizada de mRNA. Estes elementos podem incluir sequências sinal, sinais de processamento, tais como promotores de transcrição, potenciadores, e sinais de terminação.

[0112] Em formas de realização práticas particularmente preferenciais da presente invenção, os genes de região variável clonados são inseridos num vetor de expressão conjuntamente com os genes sintéticos de região constante de cadeia pesada e leve (preferencialmente humanos), tal como acima discutido. Numa forma de realização prática da presente invenção, isto é efetuado utilizando um vetor de expressão proprietário da Biogen IDEC, Inc., referido como NEOSPLA (divulgado no Pedido de Patente E.U.A. 6,159,730). Este vetor

contêm o promotor/potenciador de citomegalovírus, o promotor principal de beta-globina de murganho, a origem de replicação SV40, a sequência de poliadenilação da hormona de crescimento bovina, os exões 1 e 2 da fosfotransferase de neomicina, o gene da dihidrofolato redutase e a sequência líder. Este vetor proporciona níveis bastante elevados de expressão de anticorpos após incorporação dos genes de região constante e variável, transfecção para células CHO, seguido de seleção em meio contendo G418 e amplificação com metotrexato. Claro que qualquer vetor de expressão capaz de elicitar a expressão em células eucarióticas pode ser utilizado na presente invenção. Exemplos de vetores adequados incluem, mas não se encontram limitados a, plasmídeos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, e pZeoSV2 (disponível a partir de Invitrogen, San Diego, CA), e o plasmídeo pCI (disponível a partir de Promega, Madison, WI). Em geral, o rastreio de números elevados de células transformadas para as que expressam níveis elevados adequados de cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas podem ser efetuadas em experimentações de rotina, por exemplo, por sistemas robóticos. São também ensinados sistemas de vetores nos Pedidos de Patente E.U.A. Nos. 5,736,137 e 5,658,570. Este sistema permite a obtenção de elevados níveis de expressão, e.g., > 30 pg/célula/dia. Outros sistemas de vetores exemplares são divulgados no Pedido de Patente E.U.A. 6,413,777.

[0113] Noutras formas de realização preferenciais da presente invenção, os anticorpos, fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes da invenção podem ser expressos utilizando construtos policistrónicos tais como os divulgados no Pedidos de Patente E.U.A. No. 2003-0157641 A1, submetido no dia 18 de Novembro de 2002.

Nestes novos sistemas de expressão, vários produtos génicos de interesse, tais como cadeias pesadas e leves de anticorpos, podem ser produzidos a partir de um único construto policistrónico. Estes sistemas utilizam, vantajosamente, um local interno de entrada do ribossoma *(internal ribosome entry site (IRES))* para permitir os níveis relativamente elevados de anticorpos. Sequências compatíveis com o IRES são divulgadas no Pedidos de Patente E.U.A. No. 6,193,980. Os peritos na arte apreciarão que estes sistemas de expressão podem ser utilizados para produzir eficazmente a gama completa de anticorpos divulgados na presente invenção.

[0114] Mais geralmente, depois de o vetor, ou sequência de DNA, codificante para uma subunidade monomérica do anticorpo ter sido preparada, o vetor de expressão pode ser introduzido numa célula hospedeira apropriada. A introdução do plasmídeo na célula hospedeira pode ser conseguida através de várias técnicas bem conhecidas pelos peritos na arte. Estas incluem, mas não se encontram limitadas a, transfecção (incluindo eletroforese e electroporação), fusão de protoplastos, precipitação com fosfato de cálcio, fusão celular com DNA envolvido, microinjeção, e infeção com vírus intacto. Ver, A. A. G. "Mammalian Expression Vetors" Vetors, Rodriguez and Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., Capítulo 24.2, pp. 470-472 (1988). Tipicamente, a introdução do plasmídeo no hospedeiro é feito através de electroporação. As células hospedeiras contendo o construto de expressão são cultivadas em condições apropriadas à produção de cadeias leves e cadeias pesadas, e avaliadas para a síntese de cadeias proteicas pesadas e/ou leves. Técnicas de avaliação exemplificativas incluem o Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzimas (ELISA), radioimunoensaio (RIA), ou análise de separação de células ativadas por fluorescência

(fluorescence-ativated cell sorter analysis (FACS)), imunohistoquímica e semelhantes.

[0115] O vetor de expressão é transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais e as células transfectadas são depois cultivadas por técnicas convencionais para produzir um anticorpo para utilização nos métodos aqui descritos. Assim, a invenção inclui células hospedeiras contendo o polinucleótido codificante para um anticorpo da invenção, ou uma cadeia pesada ou leve deste, operativamente ligada a um promotor heterólogo. Em formas de realização preferenciais da presente invenção para a expressão de anticorpos de cadeia dupla, os vetores codificantes para as cadeias pesadas e leves podem ser co-expressos na célula hospedeira para a expressão de uma molécula completa de imunoglobulina, como detalhado em baixo.

[0116] A presente invenção refere-se ainda a células hospedeiras transformadas com um polinucleótido ou vetor da invenção. As referidas células hospedeiras podem ser procarióticas ou eucarióticas. O polinucleótido ou vetor que se encontra presente na célula hospedeira pode ser integrado no genoma da célula hospedeira ou pode ser mantido de forma extracromossomal. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica, tal como uma célula bacteriana, de inseto, fúngica, vegetal, animal ou humana. Células fúngicas preferenciais são, por exemplo, as do género *Saccharomyces*, em particular as da espécie *S. cerevisiae*. O termo "procariótico" pretende incluir todas as bactérias que podem ser transformadas ou transfectadas com moléculas de DNA ou RNA para a expressão de um anticorpo da invenção, ou as cadeias de imunoglobulina correspondentes. Hospedeiros procarióticos podem incluir bactérias gram negativas tal

como bactérias gram positivas, como por exemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis*. O termo "eucariótico" pretende incluir células de levedura, plantas superiores, insetos e preferencialmente de mamíferos, mais preferencialmente células HEK-293, NSO e CHO. Dependendo do hospedeiro utilizado num método de produção recombinante, os anticorpos, ou cadeias de imunoglobulinas, codificados pelo polinucleótido da presente invenção pode ser glicosilado ou não glicosilado. Os anticorpos da invenção, ou cadeias de imunoglobulina correspondentes, podem também incluir um resíduo inicial do aminoácido metionina. Um polinucleótido da invenção pode ser utilizado para transformar ou transfectar o hospedeiro utilizando qualquer uma das técnicas comummente conhecidas pelos peritos na arte. Para além disso, os métodos para a preparação de fusão de genes operativamente ligados e a expressão destes em, e.g., células de mamífero e em bactérias são bem conhecidos no estado da arte (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Os construtos genéticos e métodos aí descritos podem ser utilizados para a expressão do anticorpo da invenção, ou as cadeias de imunoglobulina correspondentes, em hospedeiros eucarióticos ou procarióticos. No geral, são utilizados, em conexão com o hospedeiro, vetores de expressão contendo sequências promotoras que facilitam a transcrição eficiente do polinucleótido inserido. O vetor de expressão contém tipicamente uma origem de replicação, um promotor, e um terminador, tal como genes específicos capazes de proporcionar a seleção fenotípica das células transformadas. Células adequadas para serem utilizadas como fonte das sequências de DNA e células hospedeiras para a expressão e secreção das imunoglobulinas podem ser obtidas a partir de uma variedade de fontes, tais como a American Type Culture

Collection ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas," Quinta edição (1985) Rockville, Maryland, E.U.A.. Para além disso, animais transgénicos, preferencialmente mamíferos, compreendendo células da invenção podem ser utilizados para a produção em larga escala do anticorpo da invenção.

[0117] Assim, numa outra forma de realização prática da presente invenção, a presente invenção refere-se a um método de produção de uma molécula de ligação a uma proteína associada a uma doença, *e.g.*, um anticorpo, ou um fragmento de ligação, ou uma(s) cadeia(s) de imunoglobulina(s) deste, compreendendo o referido método as etapas de:

(a) cultura de células tal como acima descrito; e
(b) isolamento do referido antigénio, molécula de ligação, anticorpo ou fragmento de ligação ou cadeia(s) de imunoglobulina(s) deste a partir de cultura.

[0118] Os hospedeiros transformados podem ser crescidos em fermentadores e cultivados de acordo com técnicas conhecidas no estado da arte para a obtenção de um crescimento celular ótimo. Depois de expressos, os anticorpos inteiros, os seus dímeros, cadeias leves e pesadas individuais, ou outras formas de imunoglobulinas da presente invenção, podem ser purificados de acordo com metodologias padrão do estado da arte, incluindo precipitação com sulfato de amónia, colunas de afinidade, cromatografia em coluna, eletroforese em gel e semelhantes; ver, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). O anticorpo, ou cadeia(s) de imunoglobulina(s) correspondente(s), da invenção pode ser isolado do meio de cultura, lisado celular, ou fracções de membrana celular. O isolamento e purificação de, *e.g.*, anticorpos, ou cadeias de imunoglobulina, da invenção expressos recombinantemente ou cadeias de imunoglobulina da

invenção pode ser feito através de qualquer método convencional, tal como, por exemplo, separações cromatográficas preparativas e separações imunológicas tais como que envolvem a utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais direcionados, *e.g.*, contra a região constante do anticorpo da invenção. Será aparente para os peritos na arte que os anticorpos da invenção podem ainda ser acoplados a outras porções para, *e.g.*, direcionamento de fármacos e aplicações de imagiologia. Tais acoplamentos podem ser conseguidos quimicamente após a expressão do anticorpo, ou antigénio, ao local de ligação, ou o acoplamento do produto pode ser introduzido no anticorpo, ou antigénio, da invenção ao nível do DNA. Os DNAs são depois expressos num sistema hospedeiro adequado, e as proteínas expressas recolhidas e, se necessário, renaturadas.

[0119] São preferidas imunoglobulinas substancialmente puras, de cerca de pelo menos 90 a 95% de homogeneidade, mais preferencialmente 98 a 99%, ou mais, de homogeneidade, para utilizações farmacêuticas. Depois de purificados, parcialmente ou até à homogeneidade, como desejado, os anticorpos podem depois ser utilizados terapeuticamente (incluindo extracorporalmente) ou no desenvolvimento e realização de procedimentos de ensaio.

[0120] A célula hospedeira pode ser co-transfectada com dois vetores de expressão da invenção, codificando o primeiro vetor um polipéptido derivado de uma cadeia pesada, e o segundo vetor codificando um polipéptido derivado de uma cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores de seleção idênticos que permitam uma expressão equalitária dos polipéptidos de cadeia pesada e leve. Alternativamente, pode ser utilizado um único vetor codificante para os polipéptidos de cadeia pesada e leve. Nestas situações, a cadeia leve é

vantajosamente colocada antes da cadeia pesada para prevenir um excesso de cadeia pesada livre tóxico (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). As sequências codificantes para as cadeias pesada e leve podem compreender cDNA ou DNA genômico.

[0121] Tal como aqui utilizado, "células hospedeiras" refere-se a células que contêm vetores construídos utilizando técnicas de DNA recombinante e codificantes para pelo menos um gene heterólogo. Nas descrições de processos para o isolamento de anticorpos de hospedeiros recombinantes, os termos "célula" e "cultura de células" são utilizados indistintamente para descrever a fonte do anticorpo, a menos que seja claramente especificado o contrário. Por outras palavras, a recuperação do polipéptido a partir das "células" pode querer significar células inteiras que foram sedimentadas, ou a partir de cultura de células contendo tanto o meio como as células em suspensão.

[0122] Pode ser utilizada uma variedade de sistemas de vetores de expressão em hospedeiros para expressar as moléculas de anticorpo para utilização nos métodos aqui descritos. Tais sistemas de expressão em hospedeiros representam veículos através dos quais as sequências codificantes de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfectadas com as sequências de nucleótidos apropriadas, expressar a molécula de anticorpo da invenção *in situ*. Estes incluem, mas não se encontram limitados a, micro-organismos tais como bactérias *(e.g., E. coli, B. subtilis)* transformados com vetores de expressão de DNA de bacteriófago recombinante, DNA plasmídico, ou DNA cosmídico, contendo as sequências codificantes para o anticorpo; leveduras *(e.g.,*

Saccharomyces, Pichia) transformadas com vetores de expressão recombinantes de levedura contendo as sequências codificantes para o anticorpo; sistemas de células de inseto infetadas com vetores de expressão recombinantes virais (*e.g.*, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV), ou transformadas com vetores de expressão recombinantes plasmídicos (*e.g.*, plasmídeo Ti), contendo as sequências codificantes para o anticorpo; ou sistemas de células de mamíferos (*e.g.*, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) contendo construtos de expressão recombinante contendo promotores derivados a partir do genoma de células de mamífero (*e.g.*, promotor de metalotioneína), ou a partir de vírus de mamíferos (*e.g.*, o promotor tardio de adenovírus; o promotor 7.5K do vírus *vaccinia*). Preferencialmente, células bacterianas, tais como *Escherichia coli*, e mais preferencialmente, células eucarióticas, especialmente para a expressão de moléculas de anticorpo recombinante inteiras, são utilizadas para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, células de mamífero, tais como células de Ovário de Hamster Chinês *(Chinese Hamster Ovary (CHO))*, em conjunto com um vetor de tal forma que o elemento principal promotor de genes iniciais-intermédios do citomegalovírus humano é um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foecking *et al.*, Gene 45:101 (1986); Cockett *et al.*, Bio/Technology 8:2 (1990)).

[0123] A linha celular utilizada para a expressão de proteína é usualmente de origem de mamífero; os peritos na arte são creditados com a capacidade de determinar, preferencialmente, linhas celulares particulares que estejam bem adequadas ao produto génico desejado para ser a partir daí expresso. Exemplos de linhas celulares hospedeiras incluem, mas não se encontram limitadas a, CHO (Ovário de Hamster Chinês), DG44 e DUXB 11 (linhas celulares de Ovário

de Hamster Chinês, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (linha celular de rim de macaco), COS (um derivado de CVI com antigénio SV40 T), VERY, BHK (rim de hamster bébé), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblasto de hamster chinês) BALBC/3T3 (fibroblasto de murganho), HAK (linha celular de rim de hamster), SP2/O (mieloma de murganho), P3x63-Ag3.653 (mieloma de murganho), BFA-1c1BPT (células endoteliais bovinas), RAJI (linfócito humano) e 293 (rim humano). São particularmente preferidas as células CHO. As linhas celulares hospedeiras encontram-se tipicamente disponíveis a partir de serviços comerciais, a Coleção de Cultura de Tecidos Americana (*American Tissue Culture Collection*) ou de literatura publicada.

[0124] Adicionalmente, uma estirpe de linha celular hospedeira pode ser escolhida que module a expressão de sequências inseridas, ou que modifique e processe o produto génico na forma específica desejada. Estas modificações (*e.g.*, glicosilação) e processamento (*e.g.*, clivagem) de produtos proteicos podem ser importantes para a função da proteína. As diferentes linhas celulares hospedeiras têm características e mecanismos específicos para o processamento pós-tradução e modificação de proteínas e produtos génicos. Linhas celulares ou sistemas hospedeiros apropriados podem ser escolhidos para garantir a correta modificação e processamento de proteínas exógenas expressas. Para este fim, células hospedeiras eucarióticas que possuam a maquinaria celular para o processamento adequado do transcrito primário, glicosilação, e fosforilação do produto génico, podem ser utilizadas.

[0125] Para a produção a longo termo, e de alto rendimento, de proteínas recombinantes, é preferencial uma expressão estável. Por exemplo, linhas celulares que expressem de forma

estável a molécula de anticorpo podem ser construídas. Em vez de serem utilizados vetores de expressão que contêm origens de replicação virais, podem ser transformadas células hospedeiras com DNA controlado por elementos de controlo de expressão apropriados (e.g., promotor, potenciador, sequências, terminadores de transcrição, locais de poliadenilação, etc.), e um marcador de seleção. Após a introdução de DNA exógeno, pode ser permitido às células manipuladas crescer durante 1-2 dias em meio enriquecido, sendo depois movidas para um meio de seleção. O marcador de seleção no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite ás células a integração estável do plasmideo nos seus cromossomas e o crescimento para a formação de focos, que podem por sua vez ser clonados e expandidos em linhas celulares. Este método pode vantajosamente ser utilizado para criar linhas celulares que expressam de forma estável a molécula de anticorpo.

[0126] Pode ser utilizado uma variedade de sistemas de seleção, incluindo, mas não se se encontrando limitado a, os genes da cinase de timidina do vírus simplex de herpes (Wigler *et al.*, Cell 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)) e adenina fosforibosiltransferase (Lowy et al., Cell 22:817 1980), que podem ser utilizados em células tk-, hgprt- ou aprt-, respetivamente. Além disso, pode ser utilizada a resistência a anti-metabolitos como base da seleção para os genes seguintes: dhfr, que confere resistência ao metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, que confere resistência aminoglicósido G-418 (Clinical Pharmacy 12: 488-

505; Wu e Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991)); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); e Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); TIB TECH 11(5):155-215 (May, 1993); e higro, que confere resistência à higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30:147 (1984). Os métodos de tecnologia de DNA recombinante, comummente conhecidos no estado da arte, que podem ser utilizados encontram-se descritos em Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); e nos Capítulos 12 e 13, Dracopoli *et al.* (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1 (1981).

[0127] Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados através da amplificação do vetor (para uma revisão, ver Bebbington e Hentschel, The use of vetors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987)). Quando um marcador no sistema de vetores expressor do anticorpo é amplificável, o aumento do nível de inibidor presente na cultura da célula hospedeira irá aumentar o número de cópias do gene marcador. Como a região amplificada se encontra associada ao gene do anticorpo, a produção do anticorpo também será aumentada (Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

[0128] A produção *in vitro* permite o aumento de escala para dar origem a grandes quantidades dos polipéptidos desejados. Técnicas para a cultura de células de mamífero sob condições de cultura de tecidos são conhecidas no estado da arte e incluem culturas homogéneas em suspensão, *e.g.*, num reator

airlift ou num reator de agitação contínuo, ou culturas celulares imobilizadas ou aprisionadas, *e.g.*, em fibras ocas, microcápsulas, em microesferas de agarose ou cartuchos cerâmicos. Se necessário e/ou desejado, as soluções de polipéptidos podem ser purificadas pelos métodos de cromatografia usuais, por exemplo filtração em gel, cromatografia de troca iónica, cromatografia sobre celulose DEAE ou cromatografia de (imuno)-afinidade, *e.g.*, após a biossíntese preferencial de um polipéptido de região de dobradiça sintético ou antes da, ou subsequentemente à, etapa de cromatografia HIC aqui descrita.

[0129] Genes codificando anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem também ser expressos em células que não sejam de mamífero, tais como células de bactéria, ou de inseto, ou de levedura. Bactérias que assimilam prontamente ácidos nucleicos incluem membros de enterobacteriaceae, tais como as estirpes de *Escherichia coli* ou *Salmonella*; Bacillaceae, tais como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, e *Haemophilus influensae*. Será ainda apreciado que, quando expressos em bactéria, os polipéptidos heterólogos tipicamente fazem parte de corpos de inclusão. Os polipéptidos heterólogos têm de ser isolados, purificados e depois organizados em moléculas funcionais. Quando são desejadas formas tetravalentes de anticorpos, as subunidades irão depois auto-organizar-se em anticorpos tetravalentes (documento WO02/096948A2).

[130] Em sistemas bacterianos, pode ser vantajosamente selecionada uma variedade de vetores de expressão, dependendo da utilização pretendida para a molécula de anticorpo a ser expressa. Por exemplo, quando é para ser produzida uma grande quantidade de uma tal proteína, para a

criação de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, podem ser desejáveis vetores que direcionem a expressão de níveis elevados de produtos de proteínas de fusão que sejam facilmente purificados. Estes vetores incluem, mas não se encontram limitados a, o vetor de expressão pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO J. 2:1791 (1983)) de *E. coli*, no qual a sequência de codificação do anticorpo pode ser individualmente ligada no interior do vetor em fase com a região codificante lacZ, de forma a ser produzida uma proteína de fusão; vetores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); e semelhantes. Também podem ser utilizados vetores pGEX para expressar polipéptidos exógenos enquanto proteínas de fusão com glutationa S-transferase (GST). No geral, estas proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas a partir de células lisadas por adsorção e ligação a uma matriz de esferas de agarose revestidas com glutationa, seguido da sua eluição na presença de glutationa livre. Os vetores pGEX foram desenhados para incluir trombina ou locais de clivagem da protease do fator Xa para que o produto do gene alvo possa ser libertado da porção GST.

[0131] Além dos procariotas, também podem ser utilizados micro-organismos eucarióticos. O micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae*, comummente conhecido como levedura de padeiro, é o micro-organismo eucariótico mais comummente utilizado, apesar de um número de outras estirpes se encontrarem comummente disponíveis, *e.g.*, *Pichia pastoris*.

[0132] Para a expressão em *Saccharomyces*, o plasmídeo YRp7, por exemplo, (Stinchcomb *et al.*, Nature 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene 10:157 (1980)) é comummente utilizado. Este plasmídeo já

contém o gene TRP1, que fornece um marcador de seleção para uma estirpe mutante de levedura que não tem a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo ATCC No. 44076 ou PEP4-1 (Jones, Genetics 85:12 (1977)). A presença da lesão trp1 enquanto característica do genoma da célula de levedura hospedeira proporciona um ambiente eficaz para a deteção de transformantes por crescimento na ausência de triptofano.

[0133] Num sistema de inseto, O vírus *Autographa californicanuclear* de poliedrose (AcNPV) é tipicamente usado como vetor para expressar genes exógenos. Este vírus cresce em células de Spodoptera *frugiperda*. A sequência codificante do anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (por exemplo o gene da poliedrina) do vírus e colocada sob o controlo de um promotor AcNPV (por exemplo o promotor de poliedrina).

[0134] Depois de uma molécula de anticorpo da invenção ter sido expressa de forma recombinante, esta pode ser purificada por qualquer método conhecido no estado da arte de purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (*e.g.*, permuta iónica, afinidade, particularmente por afinidade para o antigénio específico após Proteína A, e cromatografia de dimensionamento em coluna), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Alternativamente, um método preferencial para o aumento da afinidade dos anticorpos da invenção é divulgado no documento US 2002 0123057 A1.

VI. Proteínas de Fusão e Conjugados

[0135] Os anticorpos da presente invenção podem compreender outro domínio, encontrando-se o referido domínio ligado por

ligações covalentes ou não covalentes. A ligação pode ser baseada em fusão genética de acordo com os métodos conhecidos no estado da arte e acima descritos, ou pode ser realizada por, *e.g.*, reticulação química conforme descrito na, *e.g.*, Aplicação Internacional WO94/04686. O domínio adicional presente na proteína de fusão compreendendo o anticorpo da presente invenção pode, preferencialmente, encontrar-se ligado por um ligante flexível, vantajosamente um ligante polipeptídico, em que o referido ligante polipeptídico compreende aminoácidos ligados por ligações peptídicas, hidrofílicos e plurais de um comprimento suficiente para compreender a distância entre o terminal carboxílico do referido domínio e o terminal amínico do anticorpo da invenção, ou vice-versa. O agente ativo terapêutico ou diagnóstico pode ser acoplado ao anticorpo da invenção, ou um fragmento de ligação a antigénio deste, de várias formas. Estas formas incluem, por exemplo, proteínas de fusão de cadeia simples compreendendo as regiões variáveis do anticorpo da invenção acoplado por métodos covalentes, tais como ligações peptídicas, ao agente ativo terapêutico ou diagnóstico. Outros exemplos incluem moléculas que compreendem pelo menos um fragmento de ligação a antigénio acoplado a moléculas adicionais covalentemente, ou não covalentemente, incluindo aqueles apresentados na lista não limitativa e ilustrativa seguinte. Traunecker, Int. J. Cancer Surp. SuDP 7 (1992), 51-52, descreve o reagente biespecífico janusina em que a região Fv direcionada para CD3 é acoplada a CD4 solúvel ou a outros ligandos tais como IL-7 e OVCA. De modo semelhante, as regiões variáveis do anticorpo da invenção podem ser construídas em moléculas Fv e acopladas a ligandos alternativos, tais como os ilustrados no artigo citado. Higgins, J. Infect Disease 166 (1992), 198-202, descreve um anticorpo hétero-conjugado composto por OKT3 reticulado a um anticorpo direcionado contra uma

sequência específica na região V3 de GP120. Estes anticorpos hétero-conjugados podem também ser construídos utilizando as regiões variáveis contidas no anticorpo da invenção. Exemplos adicionais de anticorpos específicos incluem os descritos por Fanger, Cancer Treat. Res. 68 (1993), 181-194 e por Fanger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 101-124.

[0136] Numa outra forma de realização prática da presente invenção, a molécula de ligação, anticorpo, cadeia de imunoglobulina ou fragmento de ligação deste, ou o antigénio, é marcado de forma detetável. Os agentes de marcação podem ser acoplados diretamente ou indiretamente aos anticorpos ou antigénios da invenção. Um exemplo de um acoplamento indireto é a utilização de uma porção de espaçamento.

[0137] Assim, a atividade biológica das moléculas de ligação, *e.g.*, anticorpos, aqui identificados sugere que estes têm afinidade suficiente para os tornar em candidatos potenciais para a localização de fármacos para células expressoras das estruturas de superfície adequadas da célula ou tecido doente, respetivamente. Este direcionamento e ligação a células pode ser útil para a entrega de agentes ativos terapêuticos ou diagnósticos e entrega de genes/terapia génica. Moléculas/partículas com um anticorpo da invenção ligar-se-iam especificamente a células/tecidos expressores da forma variante da proteína patológica, tendo, desta forma, utilidade diagnóstica e terapêutica. Assim, a molécula de ligação, *e.g.*, anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, da presente invenção pode ser marcada (*e.g.*, por fluorescência, por radioatividade, enzimaticamente, por magnetismo nuclear, ou por metais pesados) e utilizada para detetar alvos específicos *in vivo* ou *in vitro* incluindo ensaios semelhantes a "imunohistoquímica" *in vitro*. *In vivo*, estas poderiam ser utilizadas de uma forma semelhante a

técnicas de imagiologia de medicina nuclear para detetar tecidos, células, ou outros materiais expressores do neo-epítopo. Assim, numa outra forma de realização prática da presente invenção, a presente invenção refere-se à utilização de uma molécula de ligação ou um anticorpo da presente invenção, ou um fragmento de ligação deste, para a preparação de uma composição para a deteção *in vivo* de um agente de direcionamento terapêutico e/ou diagnóstico para uma proteína associada a uma doença no cérebro, detetando, suprimindo a formação de ou reduzindo os agregados de proteína patológicos, ou conformações num sujeito, para melhorar a cognição ou abrandar ou reverter o declínio cognitivo associado à doença, ou para a extração extracorporal de compostos patológicos ou os seus precursores de fluídos corporais.

[0138] Em determinadas formas de realização práticas da presente invenção, o polipéptido do anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos, ou uma ou mais porções, não normalmente associadas a um anticorpo. Modificações exemplificativas são descritas em maior detalhe em baixo. Por exemplo, um fragmento de anticorpo de cadeia simples fv da invenção pode conter uma sequência ligante flexível, ou pode ser modificado para adicionar uma porção funcional (*e.g.*, PEG, um fármaco, uma toxina, ou um marcador).

[0139] Um polipéptido de anticorpo da invenção pode compreender, consistir essencialmente de, ou consistir numa proteína de fusão. As proteínas de fusão são proteínas quiméricas que compreendem, por exemplo, um domínio de ligação a antigénio de imunoglobulina com pelo menos um local de ligação ao alvo, e pelo menos uma porção heteróloga, *i.e.*, uma porção com a qual este não se encontra normalmente associado na natureza. As sequências de aminoácidos podem

existir normalmente em proteínas separadas que são unidas no polipéptido de fusão, ou podem existir normalmente na mesma proteína mas colocadas num novo arranjo no polipéptido de fusão. As proteínas de fusão podem ser criadas, por exemplo, por síntese química, ou através da criação e tradução de um polinucleótido no qual as regiões do péptido são codificadas numa relação desejada.

[0140] O termo "heterólogo" tal como aplicado a um polinucleótido ou a um polipéptido, significa que o polinucleótido ou polipéptido é derivado de uma entidade distinta do resto da entidade com a qual está a ser comparado. Por exemplo, tal como aqui utilizado, um "polipéptido heterólogo" a ser fundido a um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou análogo deste é derivado de um polipéptido, não de imunoglobulina, da mesma espécie, ou um polipéptido de imunoglobulina ou não de imunoglobulina, de uma espécie diferente.

[0141] Tal como discutido em maior detalhe noutro local deste documento, anticorpos, fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem ainda ser fundidos de forma recombinante a um polipéptido heterólogo no terminal carboxílico ou amínico, ou quimicamente conjugado (incluindo conjugações covalentes e não covalentes) a polipéptidos ou outras composições. Por exemplo, os anticorpos podem ser fundidos de forma recombinante ou conjugados a moléculas úteis enquanto marcadores em ensaios de deteção e moléculas efetoreas, tais como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionuclídios, ou toxinas. Ver, e.g., publicações PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Pedido de Patente E.U.A. No. 5,314,995; e EP 396,387.

[0142] Anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem ser compostos por aminoácidos unidos por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, *i.e.*, isosteres peptídicas, e podem conter aminácidos diferentes dos 20 aminoácidos codificados por genes. Os anticorpos podem ser modificados por processos naturais, tais como processamento pós-tradução, ou por técnicas de modificação química bem conhecidas no estado da arte. Estas modificações encontram-se bem descritas em textos básicos e, em maior detalhe, em monografias, tal como numa extensa literatura de investigação. As modificações podem ocorrer em qualquer lugar do anticorpo, incluindo o esqueleto peptídico, as cadeias laterais dos aminoácidos e os terminais carboxílicos ou amínicos, ou em porções tais como carbohidratos. Será apreciado que o mesmo tipo de modificação pode encontrar-se presente no mesmo nível, ou em níveis diferentes, em vários locais de um dado anticorpo. Adicionalmente, um dado anticorpo pode conter muitos tipos de modificações. Os anticorpos podem ser ramificados, por exemplo, como resultado de ubiquitinação, e podem ser cíclicos, com ou sem ramificações. Anticorpos cíclicos, ramificados, e cíclicos ramificados podem resultar de processos de pós-tradução naturais ou podem ser criados por métodos sintéticos. As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma porção heme, ligação covalente de um nucleótido ou derivativo de um nucleótido, ligação covalente de um lípido ou derivativo de um lípido, ligação covalente de fosfotidilinositol, reticulação, ciclização, formação de pontes dissulfeto, demetilação, formação de reticulação covalente, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristoilação,

oxidação, pegilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, transferência de RNA mediada por adição de aminoácidos a proteínas como a arginilação e a ubiquitinação. (Ver, *e.g.*, Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, Meth Enzymol 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992)).

[0143] A presente invenção também fornece proteínas de fusão compreendendo um anticorpo, um fragmento de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos deste, e um polipéptido heterólogo. Numa forma de realização prática da presente invenção, uma proteína de fusão da invenção compreende, consiste essencialmente em, ou consiste num, polipéptido contendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais regiões VH de um anticorpo da invenção ou a sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais regiões VL de um anticorpo da invenção, ou fragmentos ou variantes deste, e uma sequência polipeptídica heteróloga. Noutra forma de realização prática da presente invenção, uma proteína de fusão para utilização nos métodos de diagnóstico e tratamento aqui divulgados compreende, consiste essencialmente em, ou consiste num polipéptido contendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas ou três das regiões VH-CDRs de um anticorpo, ou fragmentos, variantes, ou derivativos deste, ou a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas ou três das regiões VL-CDRs de um anticorpo, ou fragmentos, variantes, ou derivativos deste, e uma sequência polipeptídica heteróloga. Numa forma de realização prática da presente invenção, a proteína de fusão compreende um polipéptido contendo a sequência de aminoácidos de uma região

VH-CDR3 de um anticorpo da presente invenção, ou fragmento, variante, ou derivativo deste, e uma sequência polipeptídica heteróloga, sendo que a proteína de fusão se liga especificamente a pelo menos um neo-epítopo de uma proteína associada a uma doença. Noutra forma de realização prática da presente invenção, uma proteína de fusão compreende um polipéptido contendo a sequência de aminoácidos de pelo menos uma região VH de um anticorpo da invenção e a sequência de aminoácidos de pelo menos uma região VL de um anticorpo da invenção, ou fragmentos, derivativos, ou variantes deste, e uma sequência polipeptídica heteróloga. Preferencialmente, as regiões VH e VL da proteína de fusão correspondem a único anticorpo (ou fragmento scFv ou Fab) que se liga especificamente a pelo menos um neo-epítopo de uma proteína associada a uma doença. Ainda noutra forma de realização prática da presente invenção, uma proteína de fusão para utilização em métodos de diagnóstico e tratamento aqui divulgados compreende um polipéptido contendo a sequência de aminoácidos de uma, duas ou três das regiões VH CDRs de um anticorpo e a sequência de aminoácidos de uma, duas ou três das regiões VL CDRs de um anticorpo, ou fragmentos ou variantes deste, e uma sequência polipeptídica heteróloga. Preferencialmente, dois, três, quatro, cinco, seis, ou mais das regiões VH-CDR(s) ou VL-CDR(s) correspondem a um único anticorpo (fragmento scFv ou Fab) da invenção. As moléculas de ácidos nucleicos codificantes destas proteínas de fusão também se encontram englobadas pela invenção.

[0144] Exemplos de proteínas de fusão reportadas na literatura incluem fusões do recetor de células T (Gascoigne *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon *et al.*, Nature 337:525-531 (1989); Traunecker *et al.*, Nature 339:68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol. USA 9:347-353 (1990); e Byrn *et al.*, Nature 344:667-670

(1990)); L-selectina (recetor de localização) (Watson *et al.*, J. Cell. Biol. 110:2221-2229 (1990); e Watson *et al.*, Nature 349:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo et *al.*, Cell 61:1303-1313 (1990)); CD28 e B7 (Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, J. Exp. Med. 174:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, Cell 66:1133-1144 (1991)); recetor TNF (Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991); e Peppel *et al.*, J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991)); e recetor de IgE (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, Abstract No. 1448 (1991)).

[0145] Tal como discutido noutro local deste documento, anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem ser fundidos a polipéptidos heterólogos para aumentar o tempo de semi-vida dos polipéptidos *in vivo* ou para utilização em imunoensaios utilizando métodos conhecidos no estado da arte. Por exemplo, numa forma de realização prática da presente invenção, PEG pode ser conjugado aos anticorpos da invenção para aumentar o seu tempo de semi-vida *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); ou Weir *et al.*, Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002).

[0146] Para além disso, anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem ser fundidos a sequências marcadoras, tais como um péptido que facilita a sua purificação ou deteção. Em formas de realização práticas preferenciais da presente invenção, a sequência marcadora de aminoácidos é um péptido de hexa-histidina, tal como o marcador fornecido num vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre outros, muitos dos quais se encontram comercialmente

disponíveis. Tal como descrito em Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por exemplo, a hexa-histidina permite a purificação conveniente da proteína de fusão. Outros marcadores peptídicos úteis para purificação incluem, mas não se encontram limitados a, o marcador "HA", que corresponde a um epítopo derivado da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, Cell 37:767 (1984)) e o marcador "flag".

[0147] As proteínas de fusão podem ser preparadas utilizando métodos que são bem conhecidos no estado da arte (ver, por exemplo, os Pedidos de Patentes E.U.A. Nos. 5,116,964 e 5,225,538). O local preciso no qual a fusão é efetuada pode ser selecionado empiricamente para otimizar a secreção ou características de ligação da proteína de fusão. O DNA codificante para a proteína de fusão é depois transfectado numa célula hospedeira para expressão.

[0148] Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados na sua forma não conjugada, ou podem ser conjugados a pelo menos uma de uma variedade de moléculas, *e.g.*, para melhorar as propriedades terapêuticas da molécula, para facilitar a deteção do alvo, ou para imagiologia ou terapia do paciente. Anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem ser marcados ou conjugados antes ou depois da purificação, quando é realizada uma purificação.

[0149] Em particular, anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção podem ser conjugados a agentes terapêuticos, pró-fármacos, péptidos, proteínas, enzimas, vírus, lípidos, modificadores de respostas biológicas, agentes farmacêuticos, ou PEG.

[0150] Conjugados que são imunotoxinas incluem anticorpos convencionais que foram extensivamente descritos no estado da arte. As toxinas podem ser acopladas aos anticorpos por técnicas de acoplamento convencionais ou podem ser produzidas imunotoxinas contendo porções de toxinas proteicas enquanto proteinas de fusão. Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados de uma forma correspondente para se obterem estas imunotoxinas. Exemplos ilustrativos destas imunotoxinas encontram-se descritos por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 e por Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

[0151] A proteína de fusão acima descrita pode ainda conter um ligante clivável, ou um local de clivagem para proteinases. Estas porções espaçadoras podem, por sua vez, ser insolúveis ou solúveis (Diener *et al.*, Science 231 (1986), 148) e podem ser selecionadas para permitir a libertação do fármaco do antigénio no local alvo. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser acoplados aos anticorpos e antigénios da presente invenção para imunoterapia são fármacos, radioisótopos, lectinas, e toxinas. Os fármacos com os quais os anticorpos e os antigénios da presente invenção podem ser conjugados incluem compostos que são referidos classicamente como fármacos, tais como mitomicina C, daunorubicina, e vinblastina. Quando utilizados anticorpos ou antigénios da invenção radioisotopicamente conjugados, *e.g.*, imunoterapia, determinados isótopos podem ser mais preferíveis do que outros dependendo de fatores como a distribuição de leucócitos, tal como a estabilidade e a emissão. Dependendo da resposta autoimune, alguns emissores podem ser preferíveis em relação a outros. No geral, radioisótopos emissores de partículas α e β são preferenciais em imunoterapia. Os emissores preferenciais são emissores de

curto alcance e elevada energia tal como ^{213}Bi. Exemplos de radioisótopos que podem ser ligados a anticorpos ou antigénios da invenção para propósitos terapêuticos incluem, mas não se encontram limitados a, ^{125}I, ^{131}I, ^{90}Y, ^{67}Cu, ^{64}Cu, ^{213}Bi, ^{211}At, ^{211}Pb, ^{47}Sc, ^{109}Pd e ^{188}Re. Outros agentes terapêuticos que podem ser acoplados à molécula de ligação, *e.g.*, anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, tal como protocolos terapêuticos *ex vivo* e *in vivo* são conhecidos, ou podem ser facilmente determinados, pelos peritos na arte. Onde quer que seja apropriado, o perito na arte pode utilizar um polinucleótido da invenção codificante para qualquer um dos anticorpos, antigénios, ou vetores correspondentes acima descritos em vez do próprio material proteico.

[0152] Os peritos na arte reconhecerão que os conjugados podem também ser organizados utilizando uma variedade de técnicas dependendo do agente selecionado para ser conjugado. Por exemplo, conjugados com biotina são preparados, *e.g.*, através da reação de um polipéptido de ligação com um éster ativado de biotina tal como o éster de N-hidroxisuccinimida biotina. De forma semelhante, os conjugados com um marcador fluorescente podem ser preparados na presença de um agente de acoplamento, *e.g.*, os aqui listados, ou por reação com um isotiocianato, preferencialmente isotiocianato de fluoresceína. Conjugados dos anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção são preparados de forma análoga.

[0153] A presente invenção engloba ainda anticorpos, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, da invenção conjugados a um agente terapêutico ou de diagnóstico. Os anticorpos podem ser utilizados de forma

diagnóstica para, por exemplo, monitorizar o desenvolvimento ou progressão de uma doença neurológica enquanto parte de um procedimento de teste clínico para, *e.g.*, determinar a eficácia de um determinado tratamento e/ou um regime de prevenção. A deteção pode ser facilitada através do acoplamento do anticorpo, ou fragmentos de ligação a antigénio, variantes, ou derivativos destes, a uma substância detetável. Exemplos de substâncias detetáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminiscentes, materiais radioativos, metais emissores de positrões utilizando várias tomografias de emissão de positrões, e iões metálicos paramagnéticos não radioativos. Ver, *e.g.*, Pedido de Patente E.U.A. No. 4,741,900 para iões metálicos que podem ser conjugados a anticorpos para utilizações de diagnóstico de acordo com a presente invenção. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, β-galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminiscentes incluem luciferase, luciferina, e aequorina; e exemplos de materiais radioativos adequados incluem ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In ou ^{99}Tc.

[0154] Um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste pode também ser marcado de forma a ser detetável por acoplamento do anticorpo a um composto quimioluminiscente. A presença do anticorpo marcado quimioluminiscentemente é depois determinada detetando a presença da luminiscência que surge durante o decurso da

reação química. Exemplos de compostos de marcação quimioluminiscente particularmente úteis são luminol, isoluminol, éster de acridina teromático, imidazol, sal de acridina e éster de oxalato.

[0155] Uma das formas pelas quais um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste pode ser marcado por forma a ser detetável é pela ligação do mesmo a uma enzima e a utilização do produto ligado num imunoensaio com enzima *(enzyme immunoassay (EIA))* (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978)); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kgaku Shoin, Tokyo (1981). A enzima, que se encontra ligada ao anticorpo reagirá com um substrato apropriado, preferencialmente um substrato cromogénico, de forma a produzir uma porção química que pode ser detetada, por exemplo, por meios espectrofotométricos, fluorimétricos ou visuais. As enzimas que podem ser utilizadas para marcar de forma detetável o anticorpo incluem, mas não se encontram limitadas a, malato desidrogenase, nuclease estafilocócica, isomerase de delta-5-esteróide, álcool desidrogenase de levedura, alfa glicerofosfato, desidrogenase, isomerase de fosfato de triose, peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-fosfato desidrogenase, glucoamilase e acetilcolinesterase. Adicionalmente, a deteção pode ser feita por métodos colorimétricos que utilizam um substrato cromogénico para uma enzima. A deteção pode também ser feita através da comparação visual da extensão da reação enzimática de um

substrato em comparação com padrões preparados de forma semelhante.

[0156] A deteção pode também ser feita utilizando qualquer um de uma variedade de imunoensaios. Por exemplo, através da marcação radiativa do anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste, é possível detetar o anticorpo através da utilização de um radioimunoensaio (RIA). (ver, por exemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)). O isótopo radiativo pode ser detetado por vários meios, incluindo, mas não limitados a, um detetor gama, um detetor de cintilações, ou autoradiografia.

[0157] Um anticorpo, ou fragmento de ligação a um antigénio, variante, ou derivativo deste pode também ser marcado de forma detetável utilizando metais emissores de fluorescência tais como 152Eu, ou outros da série dos lantanídeos. Estes metais podem ser ligados ao anticorpo utilizando grupos quelantes de metais tais como ácido dietilenotriaminopentacético *(diethylenetriaminepentacetic acid (DTPA))* ou ácido etilenodiaminotetraacético *(ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)*.

[0158] São bem conhecidas técnicas para a conjugação de várias porções a um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio, variante, ou derivativo deste, ver, e.g., Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", em Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987);

Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et *al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), e Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982).

[0159] Em determinadas formas de realização práticas da presente invenção, pode ser conjugada uma porção que aumenta a estabilidade ou eficácia de uma molécula de ligação, *e.g.*, um polipéptido de ligação, *e.g.*, um anticorpo, ou fragmento imunoespecífico deste. Por exemplo, numa forma de realização prática da presente invenção, PEG pode ser conjugado às moléculas de ligação da invenção para aumentar o seu tempo de semi-vida *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); ou Weir *et al.*, Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002).

VII. Composições e Métodos de Utilização

[0160] Além disso, a presente invenção refere-se a composições compreendendo a molécula de ligação acima mencionada, *e.g.*, anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, da presente invenção, ou derivativos químicos deste, ou o polinucleótido, vetor ou célula da invenção. A composição da presente invenção pode ainda compreender um transportador farmaceuticamente aceitável. O termo "derivativo químico" descreve uma molécula que contém porções químicas adicionais que não são normalmente parte da molécula de base. Estas porções podem melhorar a

solubilidade, tempo de semi-vida, absorção, etc., da molécula de base. Alternativamente, as porções podem atenuar efeitos secundários indesejados da molécula de base ou diminuir a toxicidade da molécula. Além disso, a composição farmacêutica da presente invenção pode compreender outros agentes, tais como interleucinas ou interferões, dependendo da utilização pretendida da composição farmacêutica. Por exemplo, para a utilização no tratamento da doença de Alzheimer, o agente adicional pode ser selecionado a partir de um grupo constituído por pequenas moléculas orgânicas, anticorpos anti-Abeta, e combinações destes. Assim, numa forma de realização prática preferencial da presente invenção, a presente invenção refere-se à utilização de uma molécula de ligação, *e.g.*, anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, da presente invenção, ou de uma molécula de ligação tendo substancialmente as mesmas afinidades de ligação de qualquer uma destas, o polinucleótido, o vetor ou a célula da presente invenção para a preparação de uma composição terapêutica ou de diagnóstico para o tratamento ou a prevenção da progressão da doença de Alzheimer; para o atenuamento dos sintomas associados com a doença de Alzheimer; para diagnosticar ou rastrear um sujeito para a presença da doença de Alzheimer, ou para determinar o risco de um sujeito desenvolver a doença de Alzheimer. A referida composição farmacêutica pode ser desenhada por forma a ser administrada de forma intravenosa, intramuscular, subcutaneamente, intraperitonialmente, de forma intranasal, parentericamente ou como um aerossol; ver também *infra*.

[0161] Numa forma de realização prática da presente invenção, a presente invenção refere-se aos anticorpos acima descritos da presente invenção para utilização no tratamento de uma doença neurológica caracterizada pela acumulação e/ou deposição anormal de beta-amiloide no sistema nervoso

central. O termo "doença neurológica" inclui, mas não se encontra limitado a, doença de Alzheimer e enfraquecimento cognitivo suave.

[0162] Uma vantagem particular da abordagem terapêutica da presente invenção reside no facto de os anticorpos derivados de células B ou células B memória de um organismo pré-clínico saudável ou invulgarmente estável clinicamente serem, com uma determinada probabilidade, capazes de prevenir a manifestação clínica da doença, ou diminuírem o risco da ocorrência da manifestação clínica da doença, ou retardarem o momento da ocorrência da manifestação clínica da doença. Tipicamente, estes anticorpos também passaram por maturação somática, *i.e.*, a otimização com respeito à seletividade e eficácia na afinidade elevada da ligação à molécula alvo através da variação somática das regiões variáveis do anticorpo.

[0163] O conhecimento de que estas células *in vivo*, *e.g.*, num humano, não foram ativadas por meio de outras proteínas fisiológicas ou estruturas celulares relacionadas, no sentido de uma reação autoimunológica ou alérgica é também de grande importância médica uma vez que significa uma hipótese consideravelmente aumentada de sobreviver com sucesso às fases de testes clínicos. Por assim dizer, a eficiência, aceitabilidade e tolerabilidade foram já demonstradas antes do desenvolvimento do anticorpo profilático ou terapêutico em pelo menos um sujeito humano. Pode assim esperar-se que, com um procedimento de acordo com a presente invenção, tanto a eficiência específica do anticorpo para a estrutura alvo enquanto agente terapêutico como a sua diminuída probabilidade de efeitos secundários aumentam a sua probabilidade de sucesso clínico.

[0164] Noutra forma de realização prática da presente invenção, a presente invenção refere-se a uma composição de diagnóstico compreendendo qualquer uma das moléculas de ligação acima descritas, anticorpos, fragmentos de ligação a antigénio, polinucleótidos, vetores, ou células da invenção e, opcionalmente, métodos adequados para a deteção tais como reagentes convencionalmente utilizados em métodos de diagnóstico baseados em imunologia ou ácidos nucleicos. Os anticorpos da invenção são, por exemplo, adequados para utilização em imunoensaios nos quais estes podem ser utilizados em fase liquida ou ligados a um transportador de fase sólida. Exemplos de imunoensaios que podem utilizar o anticorpo da invenção são imunoensaios competitivos e não competitivos num formato direto ou indireto. São exemplos de tais imunoensaios os radioimunoensaios (RIA), a sanduíche (ensaio imunométrico), citometria de fluxo e os ensaios de *Western blot*. Os antigénios e anticorpos da invenção podem ser ligados a muitos transportadores diferentes e utilizados para isolar células especificamente ligadas a estes. Exemplos de transportadores bem conhecidos incluem vidro, polistireno, cloreto de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, *nylon*, amiloses, celuloses naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetite. A natureza do transportador pode ser solúvel ou insolúvel para os propósitos da invenção. Existem vários marcadores e métodos de marcação diferentes conhecidos dos peritos na arte. Exemplos de tipos de marcadores que podem ser utilizados na presente invenção incluem enzimas, radioisótopos, metais coloidais, compostos fluorescentes, compostos quimioluminiscentes, e compostos bioluminiscentes; ver também as formas de realização práticas da presente invenção acima discutidas.

[0165] Numa outra forma de realização prática da presente invenção, as moléculas de ligação, em particular anticorpos da presente invenção, podem também ser utilizados num método para o diagnóstico de uma doença num indivíduo através da obtenção de uma amostra de fluídos corporais do indivíduo testado, que pode ser uma amostra de sangue, uma amostra de linfa ou de qualquer outro fluído corporal e o contacto da amostra de fluídos corporais com um anticorpo da presente invenção sob condições que permitam a formação de complexos anticorpo-antigénio. O nível destes complexos é então determinado por métodos conhecidos no estado da arte, sendo um nível significativamente superior que o formado numa amostra de controlo indicativo da presença da doença no indivíduo. Da mesma forma, o antigénio específico ligado pelos anticorpos da presente invenção pode também ser utilizado. Assim, a presente invenção refere-se a um imunoensaio *in vitro* compreendendo a molécula de ligação, *e.g.*, anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, da invenção.

[0166] Neste contexto, a presente invenção também se refere a meios especificamente desenhados para este propósito. Por exemplo, uma matriz baseada em proteínas ou anticorpos pode ser utilizada, que é carregada por exemplo com antigénios derivados da mencionada proteína associada a doença, e contendo o neo-epítopo por forma a detetar autoanticorpos que podem encontrar-se presentes em pacientes que sofrem de, e.g., uma doença neurológica, particularmente a doença de Alzheimer, ou com anticorpos, ou moléculas de ligação a antigénio equivalentes, da presente invenção que reconhecem especificamente qualquer uma destas proteínas. Por exemplo, o perfilamento antigénico por *microarray* de autoanticorpos em artrite reumatoide foi reportado por Hueber *et al.*, Arthritis Rheum. 52 (2005), 2645-2655. O desenho de

imunoensaios de *microarray* é sumarizado em Kusnezow *et al.*, Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696. Consequentemente, a presente invenção também se refere a *microarrays* carregados com moléculas de ligação ou antigénios identificados de acordo com a presente invenção.

[0167] A presente invenção também fornece um *pack* farmacêutico ou um *kit* diagnóstico compreendendo um ou mais recipientes enchidos com um ou mais dos ingredientes acima descritos, e.g., molécula de ligação, anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, antigénio, polinucleótido, vetor ou célula da presente invenção. Pode encontrar-se associado a este(s) recipiente(s) um aviso na forma prescrita por uma agência governamental que regula a produção, utilização ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a aprovação pela agência de produção, utilização e venda para administração humana. Adicionalmente, ou alternativamente, o *kit* compreende reagentes e/ou instruções para utilização em ensaios de diagnóstico apropriados. A composição, e.g., *kit* da presente invenção, é obviamente particularmente adequada para o diagnóstico, prevenção e tratamento de uma doença que é acompanhada da presença de uma proteína associada a doença, tal como acima descrito, especialmente amiloidose, e em particular aplicável ao tratamento da doença de Alzheimer (DA).

[0168] Os termos "tratamento", "tratar" e semelhantes são aqui utilizados para significar geralmente a obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico. O efeito pode ser profilático em termos de prevenção completa ou parcial de uma doença, ou sintomas desta, e/ou pode ser terapêutico em termos da cura completa ou parcial de uma doença e/ou efeitos adversos atribuídos a essa doença. O termo "tratamento" tal

como aqui utilizado cobre qualquer tratamento de uma doença em mamífero, particularmente um humano, e inclui: (a) prevenir a ocorrência da doença num sujeito que pode estar predisposto à doença, mas que não tenha ainda sido diagnosticado como tendo essa doença; (b) inibição da doença, *e.g.*, travando o seu desenvolvimento; (c) aliviando a doença, *e.g.*, causando a regressão da doença.

[0169] Para além disso, o termo "sujeito" ou "paciente" refere-se a um mamífero, preferencialmente um humano, com necessidade do tratamento para uma condição, desordem ou doença.

[0170] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser formuladas de acordo com métodos bem conhecidos no estado da arte; ver por exemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. São conhecidos no estado da arte exemplos de transportadores farmacêuticos adequados, que incluem soluções salinas tamponadas de fosfato, água, emulsões, tais como emulsões óleo/água, vários tipos de agente molhantes, soluções estéreis, etc. As composições compreendendo estes transportadores podem ser formuladas por métodos convencionais bem conhecidos. Estas composições farmacêuticas podem ser administradas ao sujeito numa dose adequada. A administração de composições adequadas pode ser realizada de diferentes formas, *e.g.*, por administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. Formulações de aerossol, tais como formulações de pulverização nasal, incluem soluções aquosas purificadas, ou outras soluções, do agente ativo com agentes conservantes e agentes isotónicos. Estas formulações são preferencialmente ajustadas a um pH e estado isotónico compatível com as membranas mucosas nasais. Formulações para

administração retal ou vaginal podem ser apresentadas enquanto um supositório com um transportador adequado.

[0171] Além disso, enquanto a presente invenção inclui o agora padrão (apesar de felizmente ser pouco frequente) procedimento de perfurar um pequeno orifício no crânio para administrar um fármaco da presente invenção, num aspeto preferencial, a molécula de ligação, especialmente o anticorpo, ou fármaco baseado no anticorpo, da presente invenção pode atravessar a barreira hematoencefálica, o que permite a administração intravenosa ou oral.

[0172] O regime de dosagem será determinado pelo médico assistente e por fatores clínicos. Como é bem conhecido nas artes médicas, as dosagens para qualquer paciente dependem de vários fatores, incluindo o tamanho, área de superfície do corpo, idade, o composto particular a ser administrado, sexo, tempo e forma de administração, saúde geral, e outros fármacos que podem estar a ser administrados simultaneamente. Uma dose típica pode ser, por exemplo, no intervalo de 0.001 a 1000 µg (ou de ácido nucleico para expressão ou para inibição da expressão neste intervalo); no entanto, doses abaixo ou acima deste intervalo exemplificativo são tidas em conta, especialmente considerando os fatores previamente mencionados. Geralmente, a dosagem pode variar, *e.g.*, entre cerca de 0.0001 e 100 mg/kg, e mais usualmente entre 0.01 e 5 mg/kg (*e.g.*, 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), de peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 1 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou dentro do intervalo entre 1-10 mg/kg, preferencialmente pelo menos 1 mg/kg. Também é pretendido que as doses intermédias nos intervalos acima descritos estejam dentro do âmbito da invenção. As doses podem ser

administradas aos pacientes de forma diária, em dias alternativos, semanalmente ou de acordo com qualquer outro cronograma determinado por análise empírica. Um tratamento exemplificativo implica a administração, em dosagens múltiplas, ao longo de um período de tempo prolongado, por exemplo, de pelo menos seis meses. Tratamentos exemplificativos adicionais implicam a administração uma vez por cada duas semanas, ou uma vez por mês, ou uma vez por cada 3 a 6 meses. Cronogramas de dosagem exemplificativos incluem 1-10 mg/kg ou 15 mg/kg em dias consecutivos, 30 mg/kg em dias alternados ou 60 mg/kg semanalmente. Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação são administrados simultaneamente, caso em que a dosagem de cada anticorpo administrado se encontra dentro dos intervalos indicados. O progresso pode ser monitorizado por avaliação periódica. As preparações para administração parentérica incluem soluções estéreis aquosas ou não aquosas, suspensões, e emulsões. São exemplos de solventes não aquosos propilenoglicol, glicol, polietilenoglicol, óleos vegetais tais como o azeite, e ésteres orgânicos injetáveis tais como oleato de etilo. Transportadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo meios tamponizados salinos. Veículos parentéricos incluem solução de cloreto de sódio, dextrose Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactado, ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem fluídos e nutrientes reabastecedores, reabastecedores de eletrólitos (como os que se baseiam na dextrose de Ringer) e semelhantes. Podem também encontrar-se presentes conservantes e outros aditivos tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes, e semelhantes. Para além disso, a composição farmacêutica da invenção pode conter outros agentes tais como dopamina, ou fármacos psicofarmacológicos, dependendo

da utilização pretendida da composição farmacêutica. Para além disso, a composição farmacêutica pode ser formulada enquanto uma vacina, por exemplo, se a composição farmacêutica da invenção compreender um anticorpo anti-Aβ para imunização passiva.

[0173] Adicionalmente, a coadministração, ou administração sequencial, de outros agentes pode ser desejável. Uma dose, ou quantidade, terapeuticamente eficaz refere-se à quantidade de ingrediente ativo suficiente para aliviar os sintomas ou a condição. A eficácia terapêutica e a toxicidade destes compostos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares, ou animais experimentais, e.g., ED_{50} (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população) e LD_{50} (a dose letal para 50% da população). A razão de dose entre os efeitos terapêuticos e efeitos tóxicos é o índice terapêutico, que pode ser expresso como a proporção LD_{50}/ED_{50}. Preferencialmente, o agente terapêutico na composição encontra-se presente numa quantidade suficiente para restaurar o comportamento normal e/ou propriedades cognitivas no caso da doença de Alzheimer.

[0174] Estas e outras formas de realização práticas da presente invenção são divulgadas e englobadas pela descrição e exemplos da presente invenção. Mais literatura acerca de qualquer um dos materiais, métodos, utilizações e compostos a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser obtidos a partir de bibliotecas e bases de dados públicas, utilizando por exemplo dispositivos eletrónicos. Pode, por exemplo, ser utilizada a base de dados pública "Medline", que é hospedada pelo National Center for Biotechnology Information e/ou o National Library of Medicine do National Institutes of Health. Outras bases de dados e endereços web, tais como os do European

Bioinformatics Institute (EBI), que faz parte do European Molecular Biology Laboratory (EMBL), são conhecidos dos peritos na arte e podem também ser obtidos utilizando motores de pesquisa da internet. Uma visão geral das informações de patentes em biotecnologia e uma avaliação de fontes relevantes de informação de patentes úteis para uma pesquisa retrospativa e para a consciência atual é dada em Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

[0175] A divulgação acima descrita, descreve, de forma geral, a invenção. Salvo indicação em contrário, um termo tal como aqui utilizado é caraterizado pela definição tal como fornecida em Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisto em 2000 e re-impresso em 2003, ISBN 0 19 850673 2. São citados vários documentos ao longo do texto desta especificação. A lista completa de citações bibliográficas pode ser encontrada no final da especificação, imediatamente antes das reivindicações.

[0176] Um entendimento mais completo pode ser obtido por referência aos seguintes exemplos especificos que são aqui fornecidos apenas para fins ilustrativos, não sendo destinados a limitar o âmbito da invenção.

EXEMPLOS

[0177] Os exemplos seguintes ilustram ainda mais a invenção, mas não devem ser interpretados como limitando o âmbito da invenção em nenhuma forma. Descrições detalhadas de métodos convencionais, tais como os aqui utilizados podem ser encontradas na literatura citada; ver também "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" Seventeenth Ed. ed por Beers e Berkow (Merck & Co., Inc. 2003).

[0178] A prática da presente invenção utilizará, a menos que indicado o contrário, técnicas convencionais de biologia celular, cultura celular, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, DNA recombinante, e imunologia, que se encontram dentro das capacidades de um perito na arte. Para uma maior elaboração de técnicas gerais úteis na prática desta invenção, o praticante pode referir-se a livros padrão e revisões em biologia celular e cultura celular; ver também as referências citadas nos exemplos. Métodos gerais em bioquímica celular e molecular podem ser encontrados nestes livros padrão tais como A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook *et al.*, Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames e Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames e Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney e Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vetors for Mammalian Cells (Miller e Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel *et al.*, eds.); e Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vetors For Mammalian Cells (Miller e Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer e Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir e Blackwell, eds., 1986). Protein Methods (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vetors for Gene Therapy (Wagner *et al.*

eds., Academic Press 1999); Viral Vetors (Kaplitt & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); e Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Os reagentes, vetores de clonagem e *kits* para manipulação genética referidos nesta divulgação encontram-se disponíveis a partir de fornecedores comerciais tais como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich, e ClonTech. As técnicas gerais de cultura cellular e recolha de meio encontram-se descritas em Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); e Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch *et al.*, Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzel *et al.*, CHAOS 11 (2001), 98-107.

[0179] As experiências seguintes são ilustradas e descritas com respeito ao anticorpo NI-101.11. No entanto, o anticorpo NI-101.12F6A é estruturalmente semelhante e pode assim esperar-se que este proporcione resultados comparáveis.

Métodos Suplementares

ELISA

[0180] Microplacas de 96 poços de metade da área (Corning) foram revestidas com péptido Abeta sintético numa concentração padronizada de 1 µg/ml em tampão de revestimento (15mM $Na2CO_3$, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9.42) durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas e os locais não específicos bloqueados durante 1 hora à temperatura ambiente com PBS contendo 2% BSA (Sigma, Buchs, Suiça). Meio condicionado de

células B foi transferido de placas de cultura de células B memória para placas de ELISA, tendo sido incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. A ligação de anticorpos humanos foi determinada utilizando anticorpos policlonais IgG anti-humanos de burro conjugados com peroxidase de rábano (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, RU) seguido da medição da atividade de HRP em ensaios colorimétricos padrão.

Clonagem molecular de anticorpos apresentando especificidades de interesse

[0181] Células B vivas, de culturas de células B memória selecionadas, são recolhidas utilizando um separador de células. É preparado mRNA e são obtidas sequências de cadeias de imunoglobulina pesadas e leves utilizando *primers* específicos de estrutura Ig para todas as famílias de regiões variáveis de estrutura 1 das cadeias pesadas e leves (FR1) enquanto *primers* 5´ em combinação com *primers* específicos para todos os segmentos J-H humanos enquanto *primers* 3´ (Marks *et al.*, Mol. Biol. 222 (1991)., 581-597). Alternativamente, RT-PCR de células individuais de células isoladamente separadas da cultura de células B memória podem ser utilizadas como fonte de sequências de cadeias pesadas e leves Ig (Babcook *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 7843-7848; Brezinschek *et al.*, J. Immunol. 155 (1995), 190-202; Coronella *et al.*, Nucleic Acids Research 28 (2000); Owens, *et al.*, J. Immunol. 171 (2003), 2725-2733). A separação de células individuais preserva o emparelhamento correto das cadeias de imunoglobulina pesadas e leves dos clones de anticorpo originalmente produzidos na cultura de células B.

[0182] A identificação do clone de anticorpo com a especificidade desejada é realizada através do re-rastreio

em *microarray* de tecido compatível com microtitulação e ELIS após a expressão recombinante de anticorpos completos. A expressão recombinante de anticorpos IgG1 completos é alcançada após inserção das sequências variáveis de cadeias pesadas e leves "na grelha de leitura correta" em vetores de expressão que complementam a sequência da região variável com a sequência codificante de um péptido sinal na extremidade 5´ e na extremidade 3´ com uma sequência codificante para o(s) domínio(s) apropriado(s). Para este fim, os *primers* contêm locais de restrição concebidos para facilitar a clonagem das sequências de cadeias variáveis pesadas e leves em vetores de expressão de anticorpos. As cadeias pesadas de imunoglobulinas são expressas através da inserção do produto de cadeia pesada de imunoglobulina RT-PCR em fase no vetor de expressão de cadeia pesada contendo um péptido sinal e os domínios constantes da imunoglobulina humana. A cadeia leve kappa de imunoglobulina é expressa através da inserção do produto de cadeia leve kappa RT-PCR em fase num vetor de expressão de cadeia leve contendo um péptido sinal e o domínio constante 1 da cadeia leve kappa da imunoglobulina humana. Alternativamente, a cadeia leve lambda de imunoglobulina é expressa através da inserção do produto de cadeia leve lambda de RT-PCR em fase num vetor de expressão de cadeia lambda contendo um péptido sinal e o domínio constante 1 da cadeia leve lambda da imunoglobulina humana.

[0183] Anticorpos monoclonais recombinantes funcionais são obtidos após co-transfecção em células HEK-293 (ou qualquer outra linha celular recipiente adequada) de um vetor de expressão de cadeia pesada Ig e um vetor de expressão de cadeia leve Ig lambda ou kappa. O anticorpo monoclonal humano recombinante é subsequentemente purificado a partir do meio condicionado utilizando uma purificação padrão com uma

coluna de Proteína A. O anticorpo monoclonal humano recombinante pode ser produzido em quantidades ilimitadas utilizando células transientemente ou estavelmente transfectadas. As linhas celulares produtoras do anticorpo monoclonal humano recombinante podem ser estabelecidas através da utilização de vetores de expressão Ig diretamente ou por re-clonagem das regiões variáveis Ig em diferentes vetores de expressão. Derivativos tais como F(ab), F(ab)2 e scFv podem também ser gerados a partir destas regiões variáveis Ig.

Protocolo experimental:

RT-PCR em massa de células B

[0184] Células vivas, identificadas pelas suas propriedades de dispersão da luz para a frente e para os lados de culturas de células B memória selecionadas, foram separadas em alíquotas de 100-2000 células diretamente em tubos de PCR de 0.2 ml enchidos com 20 µl de RNAlater (Ambion, Huntingdon, RU) utilizando um separador de células MoFlo. O mRNA foi preparado utilizando o mRNA-Direct Micro Kit (Dynal, Invitrogen, Basileia, Suiça). O cDNA foi preparado utilizando o Kit "RT for PCR" (Clontech BectonDickinson, Basileia, Suiça) e foi realizada PCR das sequências variáveis das cadeias pesadas e leves de imunoglobulina (Ig) utilizando o Kit Advantage 2 PCR (Clontech) utilizando *primers* específicos de estrutura Ig para todas as famílias de regiões variáveis de estrutura 1 das cadeias pesadas e leves (FR1) enquanto *primers* 5' em combinação com *primers* específicos para todos os domínios constantes da cadeia pesada Ig ou cadeia leve Ig lambda ou kappa enquanto *primers* 3'. Os *primers* foram adquiridos a partir de Microsynth (Balgach, Suiça).

[0185] Um péptido sinal que foi utilizado em todos os vetores de expressão foi derivado da sequência L5 da família 1 de cadeias leves kappa de imunglobulina humana (MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRC; SEQ ID NO: 2) tal como descrito na V-Base e desenhado para proporcionar o local de restrição Xba 1 por forma a facilitar a clonagem de regiões variáveis amplificadas por PCR (ATGGACATGCGGGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCT CTAGATGC; SEQ ID NO: 1). O local de restrição Xba 1 foi introduzido por mutagénese silenciosa. Foi introduzido o local de restrição Sal 1 como o local de restrição 3' utilizado para a clonagem de regiões variáveis de cadeias pesadas, em C1 de IgG1 fornecida pelo vetor. De igual forma, o local de restrição BsiW1 foi introduzido em C1 da cadeia leve kappa, e Xho 1 foi introduzido em C1 da cadeia leve lambda. A digestão por restrição dos produtos de PCR e a sua ligação em vetores recipientes foram realizadas de acordo com procedimentos padrão. O DNA plasmídico foi preparado utilizando *kits* padrão (Quiagen, Hombrechtikon, Suíça). Os vetores recipientes contêm um promotor CMV para a expressão de genes de anticorpo em células de mamífero.

Expressão de anticorpos monoclonais recombinantes funcionais

[0186] Os anticorpos podem ser produzidos em quantidades suficientes por expressão recombinante utilizando as tecnologias conhecidas no estado da arte (Trill *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 6 (1995), 553-601). Foi produzida até 1 mg de anticorpo monoclonal recombinante humano após transfecção transiente de células HEK-293. Foram produzidas até 100 mg após transdução estável de células HEK-293 ou células murinas NSO utilizando vetores recombinantes de lentivírus.

Produção em pequena escala de anticorpo recombinante humano por transfecção transiente

[0187] Vetores de cadeia pesada de Ig e vetores de cadeia leve Ig foram co-transfectados em células HEK-293 utilizando o método padrão de co-precipitação com fosfato de cálcio. Os anticorpos recombinantes foram purificados do meio condicionado e transfectados em células HEK-293 utilizando uma coluna de purificação de Proteína A (GE-Healthcare, Otelfingen, Suiça).

Produção em larga escala de anticorpo recombinante humano por transdução estável

[0188] Aqui, foi utilizado um sistema de transfecção baseado em lentivírus para gerar linhas celulares estavelmente transduzidas produtoras de anticorpos recombinantes humanos (Zufferey *et al.*, J. Virol. 72 (1998), 9873-9880). Células HEK-293 foram co-transduzidas com dois lentivetores distintos, um contendo uma cassete de expressão para uma cadeia pesada de Ig, e o outro contendo a cassete para a cadeia leve de Ig de um anticorpo recombinante. Este método de transdução pode ser utilizado numa grande variedade de linhas celulares de mamífero tais como células CHO e NSO.

Validação em em modelos de murganho transgênicos de doenças humanas

[0189] Murganhos transgénicos foram gerados tal como previamente descrito (Knobloch *et al.*, Neurobiol. Aging 28 de Julho (2006)) num fundo híbrido de C57B1/6 e DBA2. O grupo de teste foi retrocruzado uma vez para C57B1/6. Os murganhos foram mantidos em condições de habitação padrão, num ciclo de luz/escuridão inverso de 12h:12h e tinham acesso livre a

comida e água. Os grupos de tratamento foram equilibrados para a idade (24 meses no primeiro teste, 26 meses no segundo teste) e género. Os murganhos foram tratados com anticorpos (3 mg/kg de peso corporal) uma vez semanalmente através de injeções intraperitoniais durante um período de tempo de 2 meses, resultando em 8 injeções por animal.

Teste comportamental do labirinto em Y

[0190] A taxa de alternância espontânea foi avaliada utilizando um labirinto de plástico em forma de Y, com tamanhos de braços de 40 x 20 x 10 cm. Durante sessões de 5 minutos, as sequências de entrada nos braços foi registada; alternância foi definida como as entradas sucessivas em três braços, em conjuntos de tripletes sobrepostos. A percentagem de alternância foi calculada como a razão entre alternâncias reais e possíveis. Após 2 meses de tratamento com anticorpo, os murganhos foram re-testados no labirinto em Y. Os experimentadores foram sempre mantidos cegos tanto para os tratamentos como para os genótipos durante toda a experiência.

Penetração da barreira hematoencefálica e ligação a estruturas anormais no cérebro

[0191] Para avaliar se os anticorpos selecionados, ou fragmentos destes, podem penetrar a barreira hematoencefálica e ligar-se aos seus alvos proteicos anormalmente agregados ou conformacionalmente alterados no cérebro, uma dose eficaz de anticorpo é administrada de forma sistémica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutânea ou intranasal a um animal transgénico que é caraterizado pela acumulação não fisiológica da proteína alvo agregada ou com conformação alterada no cérebro. A

ligação do anticorpo às estruturas específicas patológicas no cérebro é depois avaliada por imunomarcação com um anticorpo Ig secundário anti-humano marcado seguido de deteção imunohistoquímica padrão.

Protocolo experimental:

[0192] Murganhos modelos transgénicos PS-1/APPswe para a doença de Alzheimer receberam duas injeções periféricas de 150 µg de NI-101.11 no dia 1 e no dia 3. Os murganhos foram sacrificados 24 horas depois da segunda injeção e perfundidos com PBS. Os cérebros foram congelados e foram preparadas fatias de tecidos a partir de tecido congelado utilizando um micrótomo. A presença de anticorpo humano em secções de criostato foi avaliada por imunomarcação com anticorpo IgG anti-humano marcado com Cy3 (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, RU). A localização de placas amiloides foi efetuada por co-marcação das secções de criostato com o anticorpo de controlo murino 6E10 Abeta-específico (disponível a partir de Covance, Número de Catálogo SIG-39320) seguido da marcação com o anticorpo IgG anti-murganho marcado com FITC. Alternativamente, a marcação com o anticorpo IgG anti-humano marcado com Cy3 foi utilizada isoladamente. As análises de fluorescência foram efetuadas num microscópio de fluorescência invertido (Leica).

Redução da patologia cerebral

[0193] Os efeitos do tratamento com o anticorpo nos níveis de alvos proteicos agregados ou conformacionalmente alterados no cérebro foram avaliados por tratamento sistémico ou entrega do anticorpo direcionada ao cérebro (intracranial, intratecal ou intraventricular), e de um anticorpo de controlo não relacionado, a um animal

transgénico com a característica acumulação não fisiológica da proteína alvo agregada ou com conformação alterada no cérebro. Os efeitos do tratamento são avaliados por imunomarcação ou marcação histoquímica dos alvos proteicos agregados ou alterados e a medição da área coberta por estes agregados, tamanho dos agregados e número de agregados, e quantificação bioquímica das concentrações das proteínas alvo em diferentes áreas do cérebro.

Ausência de efeitos secundários relacionados com o tratamento com o anticorpo

[0194] Potenciais efeitos adversos relacionados com o alvo do tratamento com o anticorpo serão avaliados por administração sistémica ou entrega do anticorpo direcionada ao cérebro (intracranial, intratecal ou intraventricular), e de um anticorpo de controlo não relacionado, a um animal transgénico com a característica acumulação não fisiológica da proteína alvo agregada ou com conformação alterada no cérebro. Os potenciais efeitos secundários serão avaliados por imunomarcação ou marcação histoquímica (*e.g.*, azul da Prússia para micro-hemorragias, hematoxilina-eosina, células brancas ativadas) e quantificação bioquímica (*e.g.*, níveis de citocinas por ELISA).

Marcação imunofluorescente de células vivas

[0195] Células HEK-293 foram transientemente transfectadas com um vetor que expressa APP selvagem humana fundida no terminal carboxílico intracelular à variante da proteína fluorescente amarela Citrina. 24 horas após transfecção, as células foram incubadas com anticorpos recombinantes humanos ou anticorpos de controlo a 4°C durante 30 minutos. Após a etapa de lavagem, a célula foi fixada e o anticorpo ligado

à superfície foi detetado utilizando anticorpos secundários marcados com Cy3 para IgG humana ou de murganho (Jackson ImmunoResearch). A análise de fluorescência foi realizada num microscópio confocal (Leica).

Preparação de fibrilas Abeta

[0196] O péptido Abeta foi adquirido de Bachem (Bubendorf, Suíça). O péptido liofilizado foi reconstituído em TFA e ressuspenso em PBS imediatamente antes da sua utilização enquanto Abeta monomérica nos ensaios. As fibrilas Abeta foram preparadas por incubação do péptido monomérico Abetal-42 a uma concentração de 100 µg/ml em PBS a 37°C durante 24 horas. O péptido monomérico Abeta e as preparações de fibrilas foram também utilizados enquanto substrato para revestir as placas de ELISA.

Western blotting

[0197] O péptido monomérico Abeta foi misturado com corante de carregamento, desnaturado por calor e 0.2 µg foram carregadas por poço e separadas num gradiente SDS-PAGE. Os *blots* foram incubados com anticorpo primário durante 2 horas. A ligação do anticorpo monoclonal humano primário, ou anticorpo de murganho de controlo 6E10, foi revelada utilizando anticorpos secundários anti-humano ou anti-murganho conjugados com Peroxidase de rábano (HRP). Os *blots* foram revelados utilizando SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Fisher Scientific, Wohlen, Suíça).

Competição de ligação a placas de amiloide em tecido

[0198] Anticorpo recombinante humano NI-101.11 foi incubado durante 2 horas com preparações de péptido Abeta. O anticorpo/preparações Abeta foram depois utilizadas para marcação imunohistoquímica de secções cerebrais obtidas a partir de um paciente com doença de Alzheimer neuropatologicamente confirmada. Foram preparadas crio-secções de 5 µm, bloqueadas com 4% BSA, 5% de soro de cabra e 5% de soro de cavalo em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente e marcadas com NI-101.11/preparações Abeta durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a etapa de lavagem, a ligação dos anticorpos humanos às secções de tecidos foi analisada utilizando anticorpos secundários para IgG humana conjugados com Cy3 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd). A análise de fluorescência foi realizada num microscópio de fluorescência invertido (Leica, Heerbrugg, Suíça).

Exemplo 1

Deteção de Anticorpos Humanos contra Estruturas Anormais Prevalentes em Doenças Humanas Cerebrais

[0199] Anticorpos de sujeitos fenotipicamente saudáveis, ou pacientes com a doença de Alzheimer invulgarmente estáveis clinicamente, foram testados por imunohistoquímica em secções de cérebro obtidas de pacientes com a doença de Alzheimer patologicamente confirmada. A Fig 1A demonstra a presença de anticorpos num paciente invulgarmente estável clinicamente que se ligam a placas de beta-amiloide tal como confirmado por co-marcação com um anticorpo conhecido contra a beta-amiloide humana (anticorpo 4G8; Fig. 1B). A presença de anticorpos num sujeito humano saudável para emaranhados neurofibrilares numa secção de tecido obtida a partir de um paciente com a doença de Alzheimer é apresentada na Figura 2A. Este resultado foi confirmado por co-marcação com um

anticorpo conhecido contra a tau humana (HT7). A Figura 3A revela a presença de anticorpos num sujeito humano saudável contra neurites distróficas numa secção de tecido obtida a partir de um paciente com a doença de Alzheimer. Marcações de controlo com um anticorpo conhecido contra a tau humana (HT7) são apresentadas na Figura 3B. Estes resultados demonstram a presença, em pacientes fenotipicamente saudáveis ou pacientes invulgarmente estáveis clinicamente, de anticorpos contra estruturas patológicas identificáveis em amostras de tecidos humanos com diagnósticos histopatologicamente confirmados.

Exemplo 2

Anticorpos Recombinantes Humanos Mantêm a Especificidade para Estruturas Anormais *in vivo* e Reconhecem o Epítopo Conformacional da Proteína Beta-Amiloide Associada a Doença em Placas de Amiloide Cerebrais mas não nos Precursores Fisiológicos ou Derivativos Não Patogénicos Desta

[0200] O anticorpo NI-101.11 foi obtido de pacientes com a doença de Alzheimer invulgarmente estáveis clinicamente com uma taxa significativamente reduzida de declínio cognitivo. O isolamento do anticorpo e produção recombinante foram realizados tal como especificados nos métodos suplementares.

NI-101.11

[0201] O anticorpo recombinante NI-101.11 foi testado para a ligação a placas de beta-amiloide cerebrais (Fig. 4). Secções cerebrais obtidas a partir de um paciente com doença de Alzheimer neuropatologicamente confirmada foram marcadas com as concentrações indicadas. A ligação do anticorpo às placas de beta-amiloide com concentrações de 50 pM sugere

uma ligação com uma elevada afinidade. A ligação do anticorpo NI-101.11 a placas de beta-amiloide a uma concentração de 0.5 nM não pode ser competida pela adição em excesso de quantidades de polipéptido linear sintético N-terminal Abeta representando as posições 1 a 16 a concentrações até cerca de 1 µM (Fig. 5). Para além disso, a ligação do anticorpo NI-101.11 a placas de beta-amiloide em secções cerebrais a uma concentração de 8 nM é competida por quantidades em excesso de fibrilas Abetal-42 (4 µM) mas não por monómeros lineares sintéticos Abetal-42 a uma concentração de 4 µM, sugerindo que o anticorpo NI-101.11 reconhece um epítopo conformacional que não se encontra presente em Abeta monomérica (Fig. 6).

[0202] Para avaliar ainda mais a ligação do anticorpo recombinante NI-101.11 a Abeta monomérica sintética, preparações de Abeta monomérica foram separadas por PAGE não desnaturante. A proteína blotada foi sondada com anticorpo recombinante humano NI-101.11 e um anticorpo de controlo contra sequências N-terminais de Abeta linear (6E10). Enquanto o anticorpo de controlo 6E10 produziu uma marcação proeminente do péptido de Abeta monomérico, nenhuma marcação foi detetada para o anticorpo humano recombinante NI-101.11, sugerindo que este anticorpo não se liga ao péptido Abeta monomérico linear mas reconhece um epítopo Abeta conformacional (Fig 7).

[0203] A ligação do anticorpo humano recombinante NI-101.11 a fibrilas amiloides artificiais preparadas a partir de péptidos Abetal-42 e Abeta monomérica foi determinada por ELISA (Fig. 8). Fibrilas Abeta sintéticas ou Abeta monomérica sintética revestida em placas de ELISA em densidades de revestimento iguais foram incubadas com NI-101.11 nas concentrações indicadas. A ligação a fibrilas amiloides

artificiais (quadrados abertos) é mais do que 100 vezes maior comparativamente a Abeta monomérica (quadrados preenchidos). O anticorpo de controlo 22C4 contra o terminal carboxílico de Abeta liga-se preferencialmente a Abeta monomérica (círculos preenchidos), e menos bem a fibrilas (círculos abertos). Isto sugere que o anticorpo NI-101-10 reconhece um epítopo conformacional que também se encontra presente em fibrilas amiloides artificiais preparadas a partir de péptidos sintéticos Abeta.

[0204] A reatividade cruzada do anticorpo humano recombinante NI-101.11 contra APP de tamanho completo celular, ou qualquer um dos seus derivativos fisiológicos, foi determinada por ensaios de ligação celular (Fig. 9).

[0205] Células HEK-293 vivas a expressarem estavelmente APP humana fundida a Citrina, enquanto marcador, foram incubadas durante 30 minutos a 4°C, para prevenir a internalização, com o anticorpo recombinante humano NI-101.11 ou o anticorpo de controlo 6E10 contra a sequência Abeta linear N-terminal. Sinais positivos para Citrina indicam células expressoras de APP. Em contraste com o anticorpo de controlo (6E10) que se liga à superfície celular APP em todas as células expressoras do construto de fusão, nenhuma ligação do anticorpo humano recombinante NI-101.11 a APP de tamanho completo é detetada. Estes dados demonstram a ausência de reatividade cruzada do anticorpo NI-101.11 com APP celular fisiológica.

[0206] A ausência de ligação de NI-101.11 a Abeta monomérica foi ainda demonstrada por cromatografia de exclusão molecular: Nenhuma ligação de NI-101.11, ou um anticorpo de controlo não relacionado, a Abetal-42 monomérica marcada com FITC foi observada (Fig. 10A, 10B). Em contraste, o anticorpo 22C4, direcionado contra um epítopo linear presente no

terminal carboxílico de Abeta, co-eluiu com monómeros Abeta1-42 marcados com FITC (Fig. 10C).

[0207] Numa ELISA competitiva, a ligação de 6E10, um anticorpo direcionado contra um epítopo linear no terminal amínico de Abeta, pôde ser completamente bloqueada após pré-incubação com concentrações em excesso de péptidos monoméricos de Abeta1-16, Abeta1-28 e Abeta1-40. Em contraste, a pré-incubação com concentrações em excesso de péptidos Abeta lineares não aboliu a ligação de NI-101.11, sugerindo que o anticorpo NI-101.11 requer um epítopo conformacional (Fig. 11).

Exemplo 3

Anticorpo Humano Recombinante contra Beta-Amiloide Cerebral Atravessa a Barreria Hematoencefálica num Modelo Transgénico Murganho de Doença de Alzheimer, e Liga-se a Placas de Beta-Amiloide Cerebrais *In vivo*

[0208] Para determinar se o anticorpo recombinante humano NI-101.11 atravessa a barreira hematoencefálica e se liga a placas de beta-amiloide *in vivo*, murganhos transgénicos modelo da doença de Alzheimer PS-1/APPswe receberam duas injeções periféricas de 150 µg de NI-101.11 no dia 1 e no dia 3. Os murganhos foram sacrificados 24 horas depois da segunda injeção e perfundidos com PBS. Os cérebros foram recolhidos e secções cerebrais foram marcadas com anticorpos marcados com FITC contra IgG humana ou com o anticorpo monoclonal Abeta de murganho 6E10, seguido de um anticorpo marcado com FITC contra IgG de murganho para confirmar a presença de placas de beta-amiloide. A marcação intensa de placas de amiloide com IgG anti-humana indicou que o anticorpo recombinante humano NI-101.11 pode atravessar a

barreira hematoencefálica dos murganhos transgénicos e ligar-se a placas de beta-amiloide em animais vivos (Fig. 15).

Exemplo 4

Anticorpo Recombinante Humano contra Beta-Amiloide Melhora o Comportamento Cognitivo Anormal e Confere uma Redução da Carga de Placas de Beta-Amiloide, Astrogliose e Microgliose num Modelo Transgénico Murganho da Doença de Alzheimer sem Aumentar a Frequência de Micro-hemorragias

[0209] Murganhos arcAbeta de 24 meses de idade, e companheiros de ninhada selvagens da mesma idade, foram tratados semanalmente intraperitonealmente com 3 mg/kg de anticorpo recombinante humano NI-101.11 ou um anticorpo de controlo humano do mesmo isotipo durante 2 meses. Para avaliar o efeito do tratamento no comportamento anormal nos murganhos transgênicos, foram realizados testes comportamentais em labirintos em Y antes e depois da conclusão do tratamento. A taxa de alternância espontânea foi avaliada utilizando um labirinto de plástico em forma de Y, com tamanhos de braços de 40 x 20 x 10 cm. Durante sessões de 5 minutos, as sequências de entrada nos braços foi registada; alternância foi definida como as entradas sucessivas em três braços, em conjuntos de tripletes sobrepostos. A percentagem de alternância foi calculada como a razão entre alternâncias reais e possíveis (definida como o número total de entradas em braços - 2), multiplicada por 100%. O desempenho de murganhos arcAbeta não tratados, e companheiros de ninhada selvagens controlo, no labirinto em Y foi comparada utilizando um teste t não pareado. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar a melhoria após tratamento de todos os 4 grupos. O

teste não paramétrico de Mann-Whitney U foi escolhido para a comparação em pares dos diferentes grupos. Performantes zero (*i.e.*, murganhos que não saíram do braço em que foram colocados) foram excluídos da análise.

[0210] Tal como foi observado em estudos prévios, murganhos não tratados arcAbeta de 24 meses de idade foram significativamente comprometidos comparativamente aos seus companheiros de ninhada selvagens (Fig. 16A, antes do tratamento; teste t não pareado, p=0.0007).

[0211] Murganhos arcAbeta tratados com NI-101.11 apresentaram claramente níveis de alteração aumentados, comparáveis com os de murganhos controlo selvagens tratados com NI-101.11 após 2 meses de tratamento. A análise do melhoramento (*i.e.*, desempenho após tratamento menos o desempenho depois do tratamento) demonstrou uma diferença significativa entre os quatro grupos (Fig. 16B, teste de Kruskal-Wallis; p=0.03). Uma análise pós-hoc em pares entre todos os grupos demonstrou que murganhos arcAbeta tratados com NI-101.11 melhoraram o seu desempenho cognitivo mais significativamente do que murganhos selvagens (Mann-Whitney U; p=0.05 NI-101.11 tg *vs.* NI-101.11 wt; p=0.008 NI-101.11 tg *vs.* control wt). Este grupo de murganhos também apresentou uma forte tendência para a melhoria do desempenho comparativamente a companheiros de ninhada transgénicos tratados com o anticorpo de controlo (Mann-Whitney-U; p=0.08 NI-101.11 tg *vs.* control tg). Todos os murganhos apresentaram uma melhoria de ~10% no seu desempenho quando re-testados, o que foi provavelmente devido ao ambiente familiar da tarefa.

[0212] Os efeitos de um tratamento crónico, 2 meses de tratamento com NI-101.11, na carga amiloide, astrogliose e

microgliose foram analisados por análise histoquímica e imunohistoquímica. Para este fim, os murganhos foram anestesiados após a conclusão do teste comportamental e perfundidos transcardialmente com PBS. Um hemisfério cerebral foi fixado em 4% paraformaldeído e embebido em parafina. Secções sagitais de 5 µm foram cortadas com um micrótomo Leica RM 2135 (Bannockburn, Illinois). A carga de placas de beta-amiloide no córtex e no hipocampo foi quantificada em secções cerebrais marcadas com Tioflavina S e Vermelho do Congo de acordo com o protocolo padrão. Para imunohistoquímica, fatias foram desparafinadas, bloqueadas com 4% BSA, 5% de soro de cabra e 5% de soro de cavalo em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos foram incubados durante a noite a 4°C utilizando as seguintes diluições: anti-GFAP (Advanced Immunochemicals) 1:500, anti-IBA1 (WAKO) 1:500. Anticorpos secundários acoplados com fluoróforos foram incubados à temperatura ambiente durante 2 horas. Foram utilizadas para marcação 2-3 secções por cérebro de murganho, espaçadas por 75 µm. Foram recolhidas 2 imagens por secção a uma magnificação de 10x para análise do córtex (região parietal e frontal). Foi recolhida a área total do hipocampo (magnificação de 5x recortada para ROI) para análise do hipocampo. A análise de imagens automatizada foi efetuada com o *software* ImageJ.

[0213] A dupla marcação de secções cerebrais de murganhos arcAbeta imunizados com 6E10 e IgG anti-humanas revelou a ligação do anticorpo NI-101.11 a depósitos de Abeta (Fig. 17, painel esquerdo), indicando que o anticorpo NI-101.11 consegue atravessar a barreira hematoencefálica e ligar-se a placas de beta-amiloide cerebrais. Nenhuma ligação do anticorpo humano para depósitos Abeta foi observada em murganhos arcAbeta tratados com o anticorpo de controlo (Fig. 17, painel direito).

[0214] [0317]O tratamento crónico com 3 mg/kg do anticorpo NI-101.11 resultou numa redução significativa da carga de placas amiloides tal como revelado por marcação com Tioflavina S e Vermelho do Congo. Esta redução atingiu níveis superiores a mais do que 50% no córtex e hipocampo comparativamente a murganhos arcAbeta tratados com o anticorpo de controlo (Fig. 18 A, B). Além da área das placas (Fig. 18 C), também foram observadas reduções significativas no número de placas observadas (Fig. 18 D) e no tamanho médio das placas (Fig. 18 E).

[0215] Para testar se um tratamento crónico com o anticorpo NI-101.11 afeta a resposta neuroinflamatória em murganhos arcAbeta, foram quantificados os astrócitos reativos e a microglia após marcação imunohistológica. Foi observada uma redução no número de astrócitos reativos (marcação anti-GFAP) no córtex em murganhos arcAbeta tratados com anticorpo NI-101.11 comparativamente aos animais tratados com anticorpo de controlo (Fig. 19A; Mann-Whitney-U; p=0.047). Não foi detetada nenhuma mudança no hipocampo. A marcação com um anticorpo contra um marcador da microglia e macrófagos (anti-Iba1) também revelou uma tendência estatística para uma inflamação reduzida (Fig. 19 B; Mann-Whitney-U; p=0.075 para tanto o córtex como para o hipocampo). A diminuição da astrocitose e microgliose encontra-se em linha com a carga beta-amiloide reduzida observada após o tratamento com o anticorpo NI-101.11.

[0216] A imunoterapia passiva com determinados anticorpos monoclonais direcionados contra Abeta pode ser associada a uma frequência aumentada de micro-hemorragias no cérebro (Pfeifer *et al.*, Science 298 (2002), 1379; Wilcock *et al.*, J Neuroinflammation 1 (2004), 24). Para avaliar os efeitos

da terapia crónica com o anticorpo NI-101.11, foi realizada marcação de secções cerebrais de murganhos arcAbeta e murganhos selvagens com azul da Prússia de Perl após o tratamento crónico com o anticorpo NI-101.11. Esta marcação revelou a presença de hemossiderina, um produto de degradação da hemoglobina, e marcador de micro-hemorragias prévias (Fig. 20). Em murganhos arcAbeta envelhecidos tratados com anticorpo de controlo, a frequência de perfis positivos para o azul da Prússia foi significativamente elevada comparativamente aos companheiros de ninhada selvagens (Mann-Whitney-U; p=0.001). O tratamento com o anticorpo NI-101.11 não deu origem a um aumento do número de micro-hemorragias quando comparado a murganhos arcAbeta tratados com anticorpo de controlo (Mann-WhitneyU; p=0.347) indicando que os efeitos terapêuticos benéficos do tratamento com anticorpo NI-101.11 ocorreram na ausência deste efeito secundário frequentemente observado na imunoterapia passiva com Abeta.

Exemplo 5

Anticorpo Recombinante Humano contra Beta-Amiloide Cerebral Inibe a Formação de Fibrilas Abeta Sintéticas *In vitro*

[0217] O efeito do anticorpo humano recombinante NI-101.11 na formação de fibrilas Abeta foi avaliado através da medição de Tioflavina S ligada a Abeta agregada por análise de fluorescência. Soluções de Abeta monomérica foram incubadas a 37°C durante 24 horas na presença de concentrações crescentes de NI-101.11. A formação de fibrilas Abeta sintéticas *in vitro* foi inibida pelo anticorpo recombinante humano NI-101.11 numa forma dependente da concentração (Fig. 21).

Exemplo 6

Efeitos de NI-101.11 em Fagocitose *Ex-vivo* de Fibrilas Abeta por Células Microgliais-Derivadas BV-2

[0218] Os efeitos do anticorpo NI-101.11 na fagocitose mediada por recetor gama Fc de fibrilas Abeta foram estudados em células microgliais-derivadas BV-2. As células BV-2 foram mantidas em meio DMEM suplementado com 5% FBS, Pen/Strep e glutamina. As células foram tripsinizadas e 120´000 células BV-2/poço foram semeadas em placas de 24 poços de fundo plano. Após 12 horas, o meio foi substituído com 400 µl de DMEM/F12/poço suplementado com 20 mM HEPES (pH 7.3), 1% BSA, 10 µg/ml Pen/Strep. Foram adicionados 100 µg/ml de Fucoidan, um inibidor do recetor *scavenger*, 30 minutos antes da experiência. 50 µM de fibrilas Abeta marcadas com FITC foram pré-incubadas com as concentrações indicadas de anticorpos durante 30 minutos a 37°C, lavadas duas vezes seguido de centrifugação durante 5 minutos a 14´000 x g. Esta suspensão foi adicionada a placas de cultura de tecidos. Após 30 minutos, as células BV-2 foram lavadas duas vezes com HBSS para remover Abeta fibrilar não associada.

[0219] As células foram tratadas com 250 µg/ml de tripsina/EDTA durante 20 minutos a 4°C e lavadas duas vezes por centrifugação a 500 x g durante 5 minutos a 4°C. As células foram fixadas durante 20 minutos em FACS-Fix (PBS 2%, FA 2%, 2% glicose, 5 mM NaN) e lavadas duas vezes com FACS de lavagem (PBS, 5 µM EDTA, 0.2% BSA). A fluorescência (FL-1) de 10´000 células foi determinada por análise de FACS (baseado em Webster SD *et al.*, JI 2001).

[0220] A fagocitose de fibrilas Abeta1-42, marcadas com FITC, dependente do recetor gama Fc, foi medida após inibição do

sistema recetor *scavenger*. A análise comparativa de NI-101.11 humano e um anticorpo comercialmente disponível direcionado para um epítopo linear no terminal amínico do péptido Abeta (6E10) demonstrou uma indução dependente da dose de fagocitose das fibrilas Abeta. A absorção de fibrilas mediada por NI-101.11 é até 3 vezes maior do que a observada para o anticorpo 6E10 (Fig. 22). Estes dados indicam que o anticorpo NI-101.11 desencadeia uma fagocitose potente de fibrilas Abeta por células microgliais dependente do recetor gama Fc.

Conclusão

[0221] Tal como demonstrado nas experiências acima descritas realizadas de acordo com a presente invenção, foi surpreendentemente possível detetar anticorpos protetores e terapeuticamente ativos e células B produtoras de anticorpos em sujeitos humanos fenotipicamente saudáveis e assintomáticos, tal como em pacientes com cursos de doenças invulgarmente estáveis clinicamente apesar do diagnóstico de comprometimento cognitivo ou doença de Alzheimer. Mais especificamente, uma nova classe de anticorpos pôde ser detetada e isolada, que descrimina a forma funcional fisiológica de um antigénio, minimizando desta forma os efeitos secundários auto-imunogénicos, até agora um problema em imunoterapia. Assim, anticorpos e moléculas de ligação equivalentes são fornecidas que reconhecem especificamente uma variante do antigénio numa estrutura patofisiologicamente relevante, à qual o anticorpo se é suposto ligar por forma a diminuir a sua toxicidade ou para reduzir a sua concentração ou para promover a sua degradação, por meio de, por exemplo, tornar o patógeno visível para macrófagos expressores de FcR ou células da microglia, e portanto torná-lo inócuo. Conforme demonstrado nos exemplos,

estes anticorpos são terapeuticamente eficazes e são capazes de suspender e também de prevenir efeitos deletérios de proteínas patológicas anormais e agregados destas sem aumentar a frequência de micro-hemorragias cerebrais.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0222]

<110> Universidade de Zurique

<120> Metódo para o fornecimento de moléculas e alvos de ligação específicos de doença

<130> NE30A06/P-EPD2-WO

<150> US 60/878,831
<151> 2007-01-05

<150> EP 07000211.8
<151> 2007-01-05

<150> US 60/934,291
<151> 2007-06-11

<150> EP 07020341.9
<151> 2007-10-17

<160> 41

<170> Patente Na versão 3.5

<210> 1

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(66)

<223> Péptido líder derivado de Vkappa I L5, local de restrição Xba 1 introduzido 3´ em relação à sequência

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(66)

<400> 1

atg gac atg cgg gtg ccc gcc cag ctg ctg ggc ctg ctg ctg ctg tgg 48

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp 66

1 5 10 15

ttc ccc ggc tct aga tgc

Phe Pro Gly Ser Arg Cys

20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys

20

<210> 3

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região_V

<222> (1) .. (372)

<223> Sequência de cadeia pesada variável (Vh) de NI-101.10

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (372)

<400> 3

gag gtg cag cta gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ggc ata cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gat agg ggt ata gga get egg egg ggg ccg tac tac atg gac 336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110

gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 5

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região_V

<222> (1) .. (372)

<223> Sequência de cadeia pesada variável (Vh) de NI-101.11

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (372)

<400> 5

gag gtg cag ctg gtg cag agc ggc ggc ggc gtg gtg cag ccc ggc cgg 48

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

agc ctg cgg ctg agc tgc gcc gcc agc ggc ttc gcc ttc agc agc tac 96

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

ggc atg cac tgg gtg cgg cag gcc ccc ggc aag ggc ctg gag tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gcc gtg atc tgg ttc gac ggc acc aag aag tac tac acc gac agc gtg 192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac agc aag aac acc ctg tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac acc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcc cgg gac cgg ggc atc ggc gcc cgg cgg ggc ccc tac tac atg gac 336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110

gtg tgg ggc aag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc 372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região_V

<222> (1) .. (327)

<223> Sequência kappa de cadeia leve variável (Vkappa) de NI-101.10 e NI-101.11

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (327)

<400> 7

gaa att gtg ctg act cag tct caa ttc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag ctc gag atc aaa cgt acg 327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 9

<211> 381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região_V

<222> (1) .. (381)

<223> Sequência de cadeia pesada variável (Vh) de NI-101.12

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (381)

<400> 9

gag gtg cag ctg gtg gag agc ggc ccc ggc ctg gtg aag ccc gcc gag 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu

1 5 10 15

acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg agc ggc ggc agc atc cgg agc ggc 96

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly

20 25 30

agc atc tgc tgg tac tgg atc cgg cag ccc ccc ggc aag ggc ctg gag 144

Ser Ile Cys Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

tgg atc ggc tac ttc tgc tac agc ggc gcc acc ttc tac acc ccc agc 192

Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser

50 55 60

ctg cgg ggc cgg ctg acc atc agc gtg gac gcc agc aag aac cag ctg 240
Leu Arg Gly Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Ala Ser Lys Asn Gln Leu
65 70 75 80

agc ctg agc ctg agc agc gtg acc gcc gcc gac acc gcc gtg tac tac 288
Ser Leu Ser Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

tgc gcc cgg cgg gcc ggc gag aac agc ggc ggc atc gag ccc tac tac 336
Cys Ala Arg Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr
100 105 110

ggc atg gac gtg tgg ggc cag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc 381
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 10
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly
20 25 30
Ser Ile Cys Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
50 55 60
Leu Arg Gly Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Ala Ser Lys Asn Gln Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr

100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 11

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região_V

<222> (1) .. (330)

<223> Sequência kappa de cadeia leve variável (Vkappa) de NI-101.12

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (330)

<400> 11

gac gag atc gtg ctg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc atc 48

Asp Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile

1 5 10 15

ggc gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gcc agc gag agc atc aac aag 96

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys

20 25 30

tac gtg aac tgg tac cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg 144
Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tac gcc gcc agc agc ctg cag agc ggc gcc ccc agc cgg gtg agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser
50 55 60

ggc agc ggc ttc ggc cgg gac ttc agc ctg acc atc agc ggc ctg cag 240
Gly Ser Gly Phe Gly Arg Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

gcc gag gac ttc ggc gcc tac ttc tgc cag cag agc tac agc gcc ccc 288
Ala Glu Asp Phe Gly Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro
85 90 95

tac acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aag cgg acc 330
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 12
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Asp Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys

20 25 30

Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Phe Gly Arg Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ala Glu Asp Phe Gly Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100 105 110

<210> 13

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
<221> Região_V
<222> (1) .. (363)
<223> Sequência de cadeia pesada variável (Vh) NI-101.13

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (363)

<400> 13

cag gta cag ctg cag gag tca ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc aga aga 96

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg

20 25 30

agt tac tac tgg ggc tgg atc cgc cag tcc cca ggg aag ggg ctg gag 144
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg agt gga agt atc cat tat agc ggg agc acc tac tac aac ccg tcc 192
Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

ctc aag agt cga gtc acc ata tct gta gac acg tcc aag aac cag ttc 240
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

tcc ctg aaa ctg agc tct gtt acc gcc gca gac acg gct gtc tat tac 288
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

tgt gcg aga tca cgt tgg ggc agc agc tgg gta ttt gac tac tgg ggc 336
Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

cag ggc aca ctg gtc acc gtc tct tcg 363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Região_V
<222> (1)..(330)
<223> Sequência lambda de cadeia leve variável (Vlambda) de NI-101.13

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (330)

<400> 15

cag age gtg ctg acc cag ccg ccg age gcg age ggc acc ccg ggc cag 48

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

cgc gtg acc att agc tgc agc ggc agc agc agc aac att ggc agc aac 96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

tat gtg tat tgg tat cag cag ccg ccg ggc acc gcg ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

att tat cgc aac aac cag cgc ccg agc ggc gtg ccg gat cgc ttt agc 192
Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agc aaa agc ggc acc agc gcg agc ctg gcg att agc ggc ctg cgc 240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

agc gaa gat gaa gcg gat tat tat tgc gcg gcg tgg gat gat agc ctg 288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

agc ggc tat gtg ttt ggc acc ggc acc aaa gtg acc gtg ctg 330
Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105 110

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR1

<400> 17

Ser Tyr Gly Ile His

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (17)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR2

<400> 18

Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (15)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR3

<400> 19

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (15)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.11 e NI-101.12F6A Vh, CDR1

<400> 20

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (17)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.11 e NI-101.12F6A Vh, CDR2

<400> 21

Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (15)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.11 e NI-101.12F6A Vh, CDR3

<400> 22

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (11)

<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 e NI-101.12F6A Vkappa, CDR1

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (7)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 e NI-101.12F6A Vkappa, CDR2

<400> 24

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (9)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 e NI-101.12F6A Vkappa, CDR3

<400> 25

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR1

<400> 26

Ser Gly Ser Ile Cys
1 5

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (19)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR2

<400> 27

Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
1 5 10 15

Leu Arg Gly

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (17)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR3

<400> 28

Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (11)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR1

<400> 29

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys Tyr Val Asn

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (7)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR2

<400> 30

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (9)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR3

<400> 31

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (7)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR1

<400> 32

Arg Arg Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (16)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR2

<400> 33

Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (11)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR3

<400> 34

Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (13)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR1

<400> 35

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (7)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR2

<400> 36

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Região determinante de complementaridade (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (11)
<223> Denominação de sequências proteicas CDR em Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR3

<400> 37

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 38

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região_V

<222> (1) .. (372)

<223> Sequência de cadeia pesada variável (Vh)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (372)

<400> 38

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac 336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110

gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 40

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região_V

<222> (1) .. (324)

<223> Sequência kappa de cadeia leve variável (Vkappa) de NI-101.12F6A

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (324)

<400> 40

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo humano isolado, ou fragmento de ligação a antigénio deste, que se liga a beta-amiloide, em que o anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, compreende:

uma região variável de cadeia pesada com a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 39; e uma região variável de cadeia leve com a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 41.

2. O anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, da reivindicação 1, que é um anticorpo humano de isotipo IgG.

3. O anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, da reivindicação 1, que é um anticorpo humano de isotipo IgG1.

4. O anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1-3, em que o anticorpo compreende uma cadeia leve kappa humana.

5. O anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, da reivindicação 1, que é um fragmento de ligação a antigénio selecionado a partir de um grupo constituído por um fragmento Fv de cadeia simples, um fragmento F(ab´), um fragmento F(ab), e um fragmento $F(ab')_2$.

6. Um polinucleótido isolado codificante para o anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

7. Um vetor de expressão compreendendo o polinucleótido da reivindicação 6.

8. Uma célula hospedeira isolada contendo o vetor de expressão da reivindicação 7, ou dois vetores de expressão, em que o primeiro vetor de expressão codifica para a região variável da cadeia pesada e o segundo vetor de expressão codifica para a região variável de cadeia leve do anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

9. Um método para a preparação de anticorpos anti-beta-amiloide, ou fragmento de ligação a antigénio destes, compreendendo o referido método as etapas de

(a) cultura da célula hospedeira da reivindicação 8 numa cultura celular; e

(b) isolamento do anticorpo anti-beta-amiloide, ou fragmento de ligação a antigénio deste, a partir da cultura celular.

10. Um anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, codificado pelo polinucleótido da reivindicação 6, ou obtível pelo método da reivindicação 9.

11. O anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 10, para utilização no tratamento da doença de Alzheimer, enfraquecimento cognitivo suave, ou acumulação anormal ou deposição de beta-amiloide no sistema nervoso central num sujeito humano.

12. O anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o

anticorpo ou fragmento de ligação a antigénio deste, é administrado de forma intravenosa, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intranasal, parenteral ou como um aerossol.

13. Uma composição farmacêutica contendo o anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 10 e um transportador farmaceuticamente aceitável.

14. Uma composição farmacêutica contendo o anticorpo, ou fragmento de ligação a antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 10 ligado a um marcador detetável.

15. A composição da reivindicação 14, em que o marcador detetável é uma enzima, grupo prostético, material fluorescente, material luminescente, material bioluminiscente, material radioativo, metal emissor de positrões, ou ião metálico paramagnético não radioativo.

16. A composição das reivindicações 14 ou 15 para utilização na deteção, *in vivo*, de deposição de beta-amiloide no cérebro de um sujeito humano.

17. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 16, em que a deposição de beta-amiloide é detetada por tomografia por emissão de positrões.

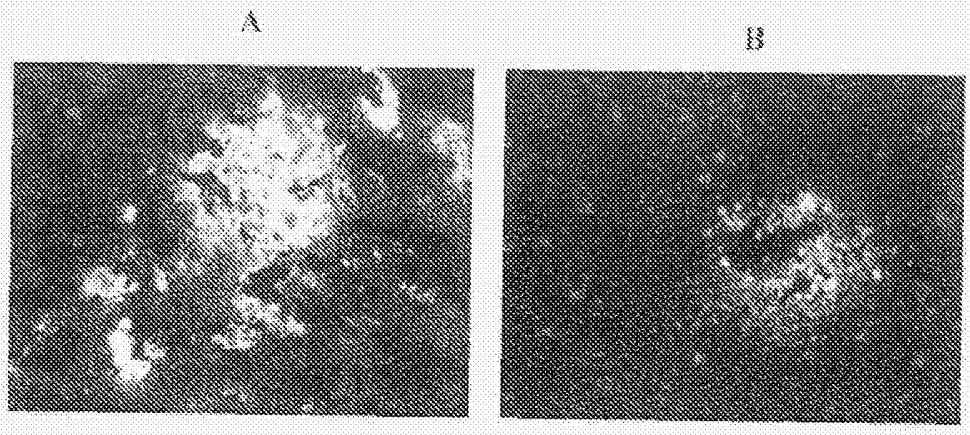


FIG. 1

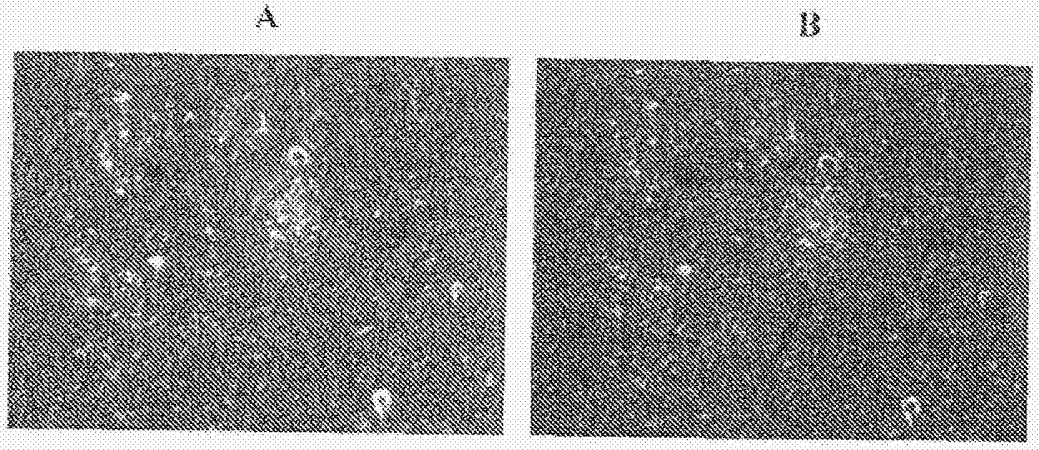


FIG. 2

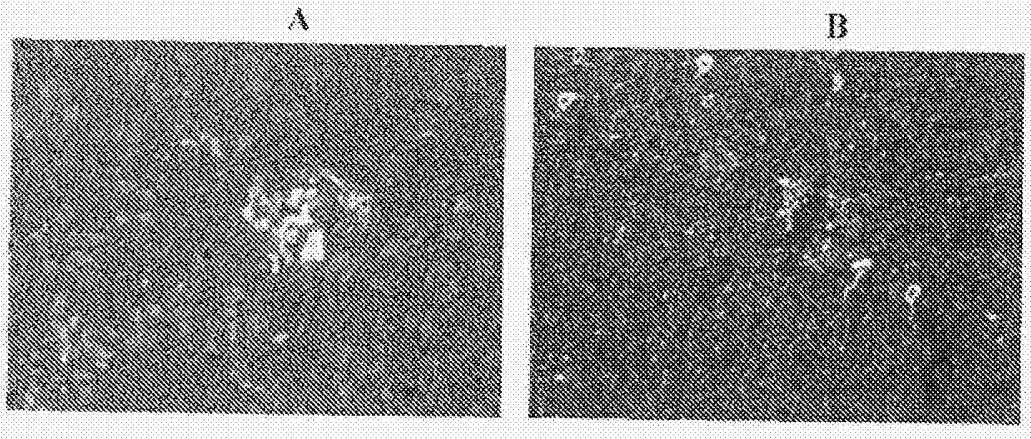


FIG. 3

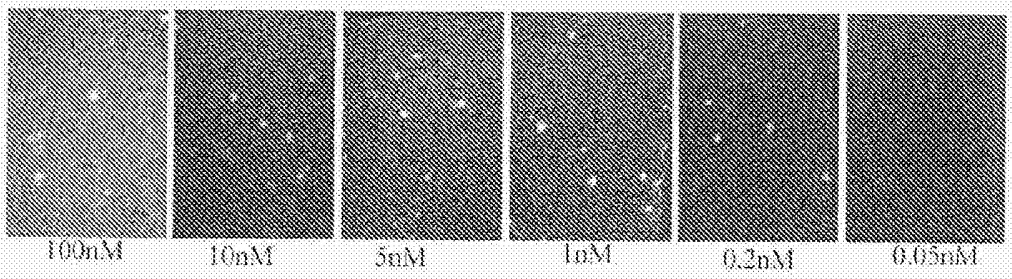


FIG. 4

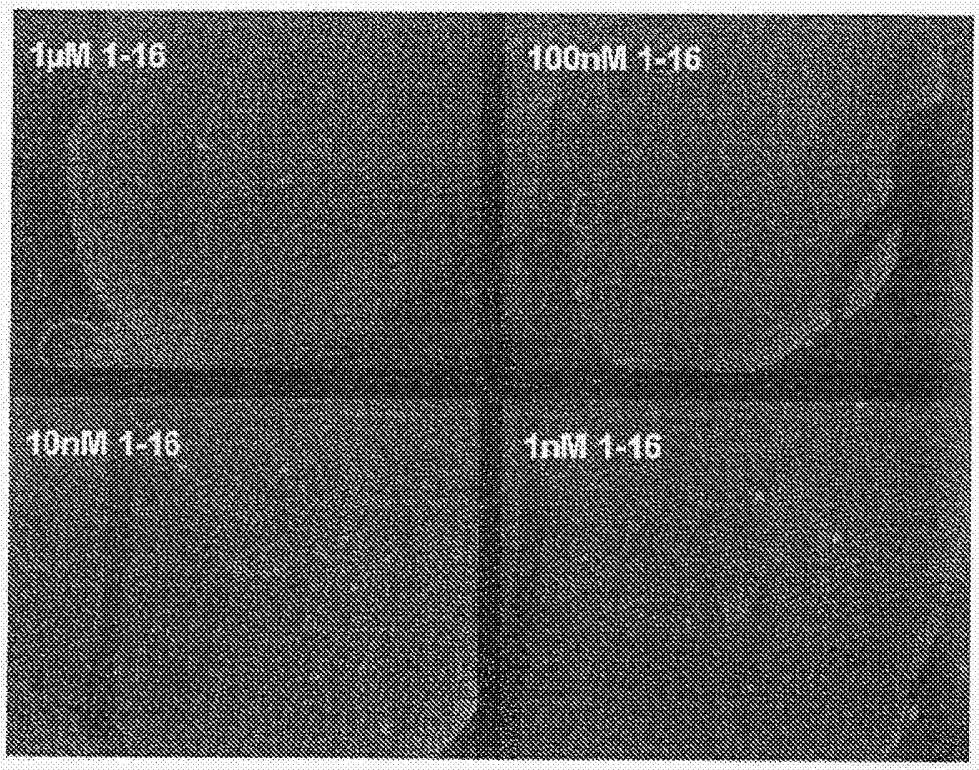


FIG. 5

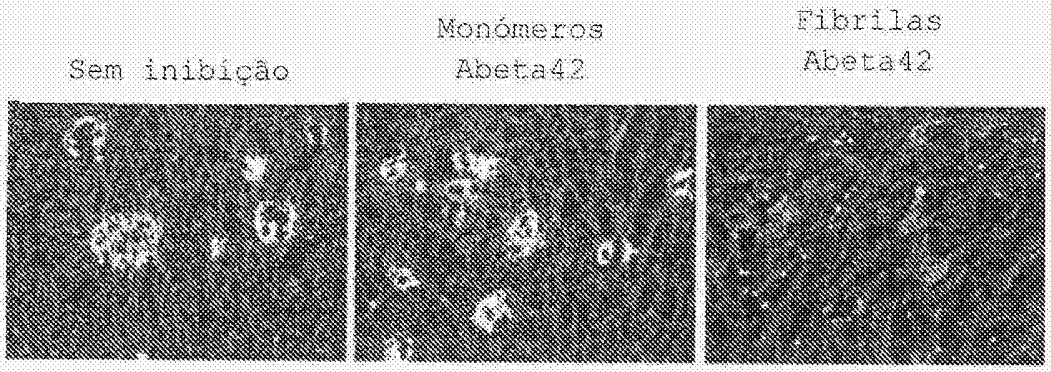


FIG. 6

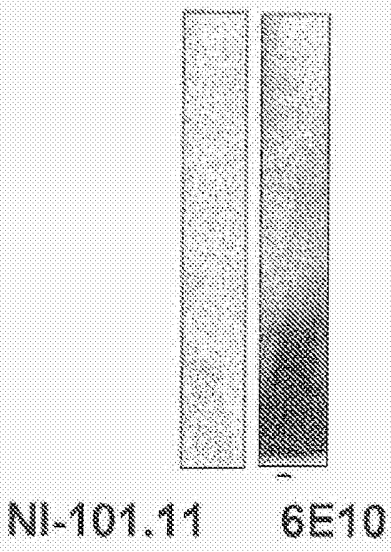

NI-101.11
6E10

FIG. 7

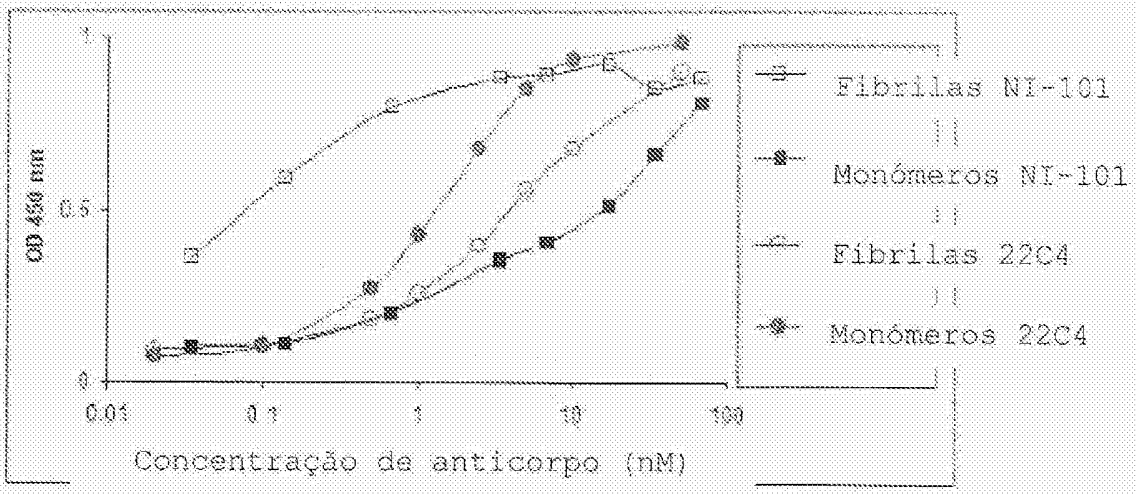

OD 450 nm
1
0.5
0
0.01
0.1
1
10
100
Concentração de anticorpo (nM)
Fibrilas NI-101
Monómeros NI-101
Fibrilas 22C4
Monómeros 22C4

FIG. 8

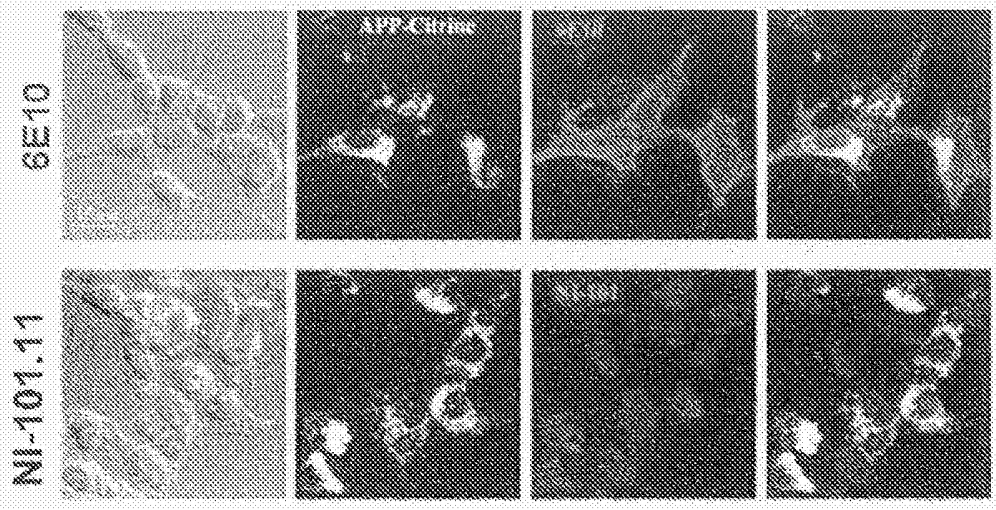
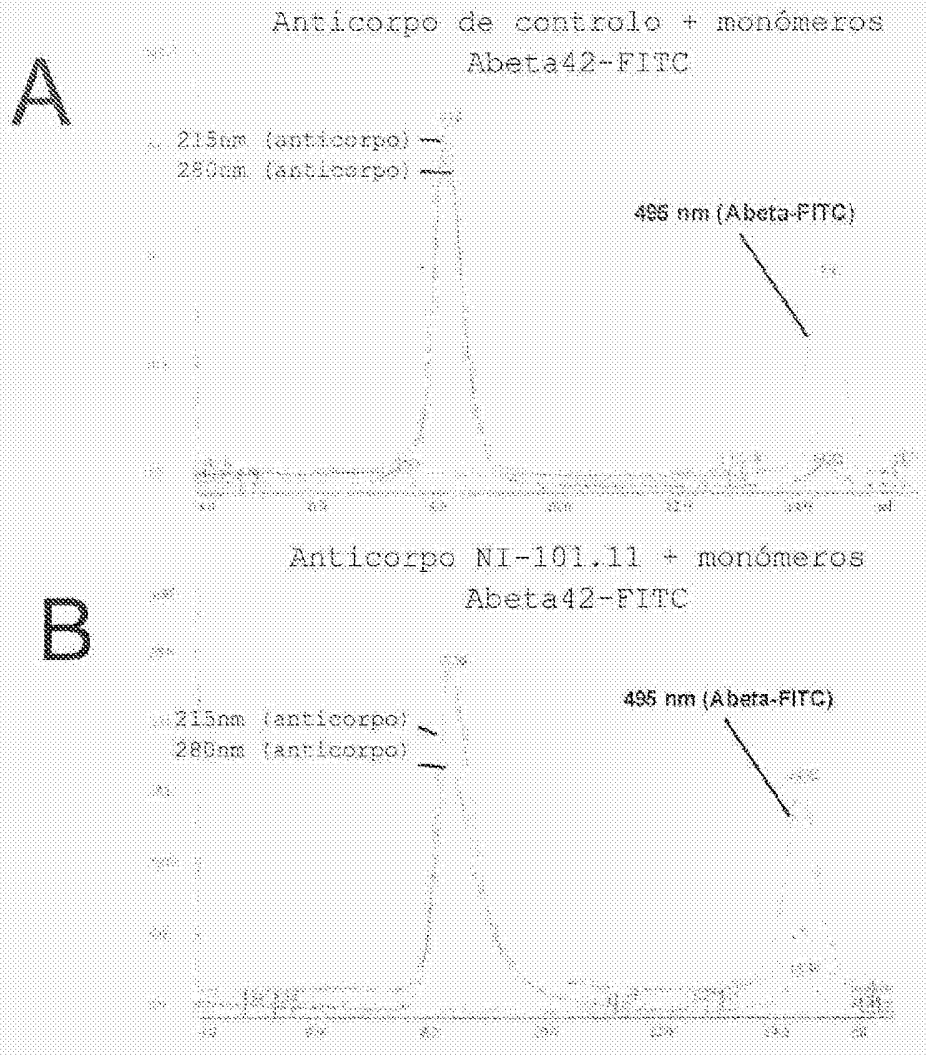

6E10
NI-101.11
APP-Citrine

FIG. 9


A
Anticorpo de controlo + monómeros Abeta42-FITC
213nm (anticorpo)
280nm (anticorpo)
495 nm (Abeta-FITC)
B
Anticorpo NI-101.11 + monómeros Abeta42-FITC
213nm (anticorpo)
280nm (anticorpo)
495 nm (Abeta-FITC)

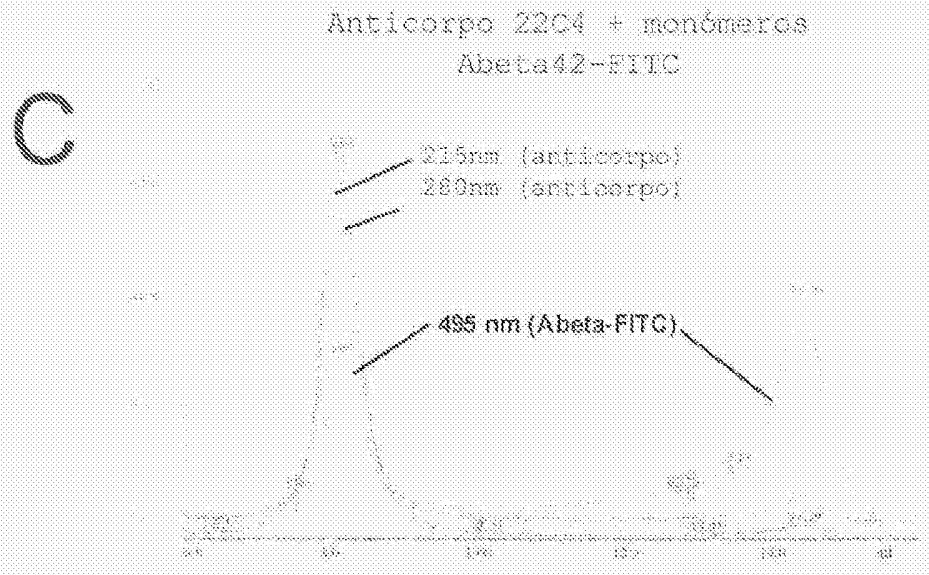


FIG. 10 A-C

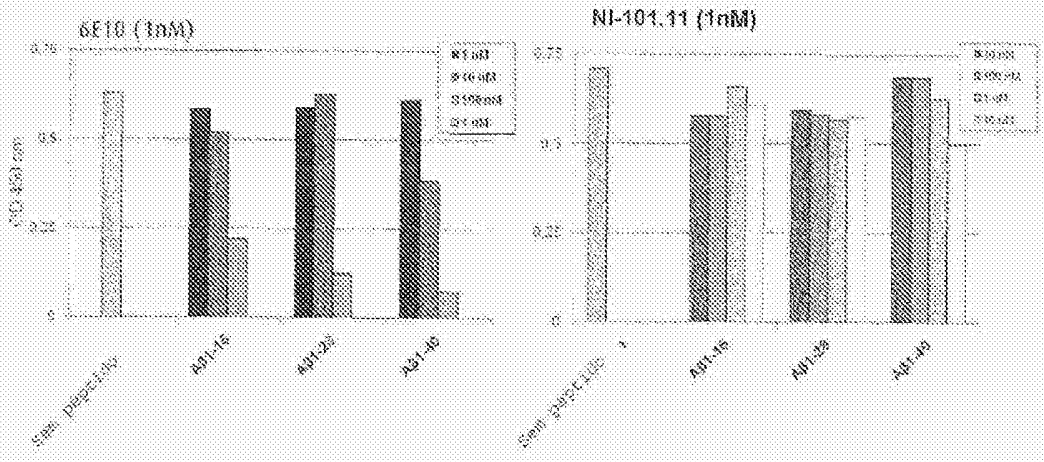


FIG. 11

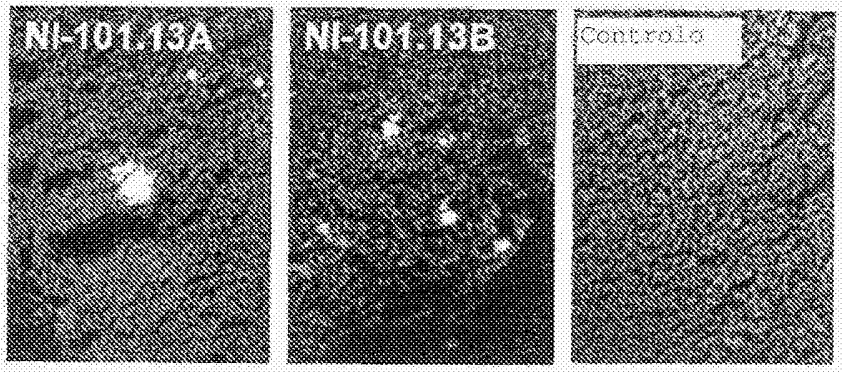


FIG. 12

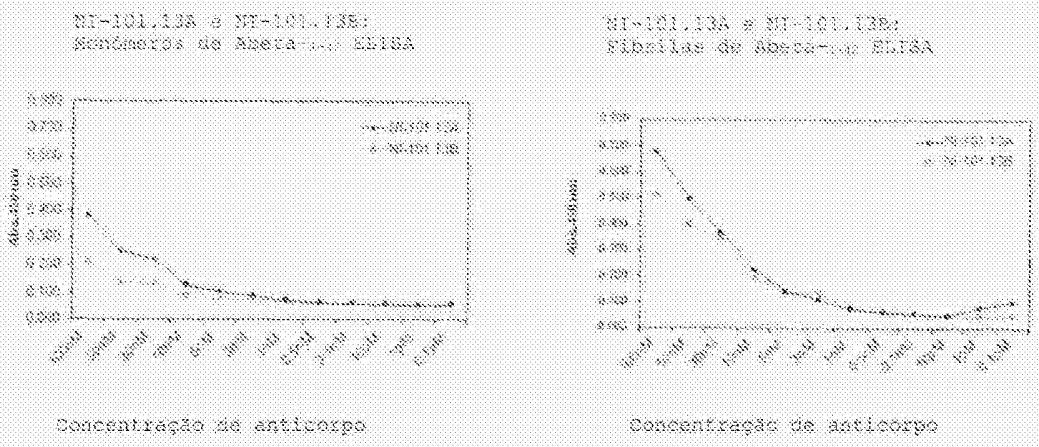


FIG. 13

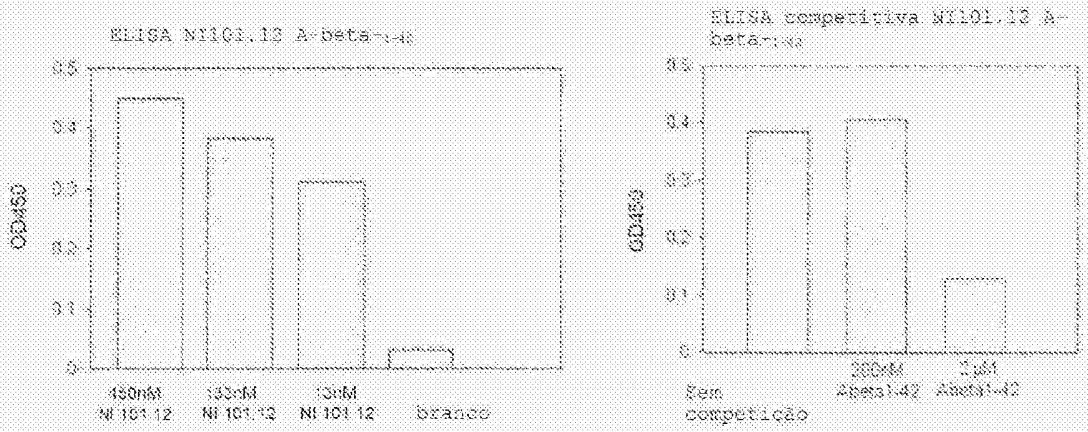


FIG. 14 A-B

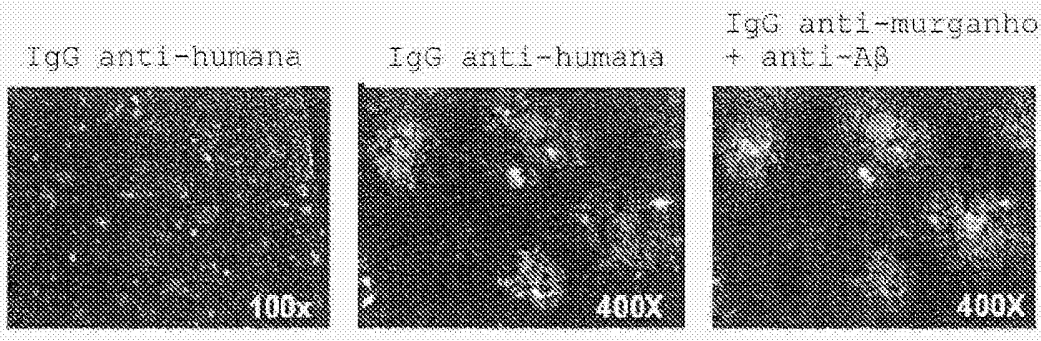


FIG. 15

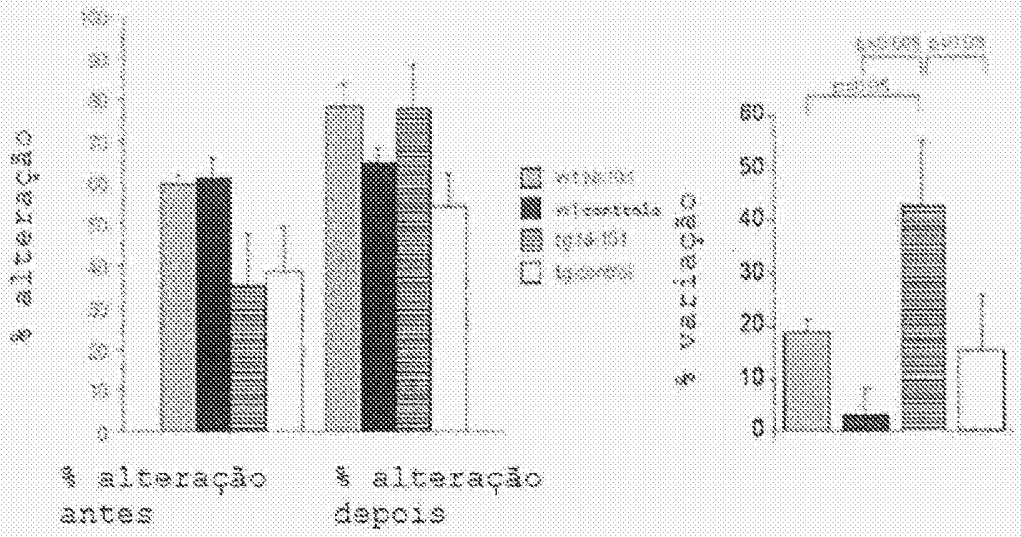


FIG. 16 A-B

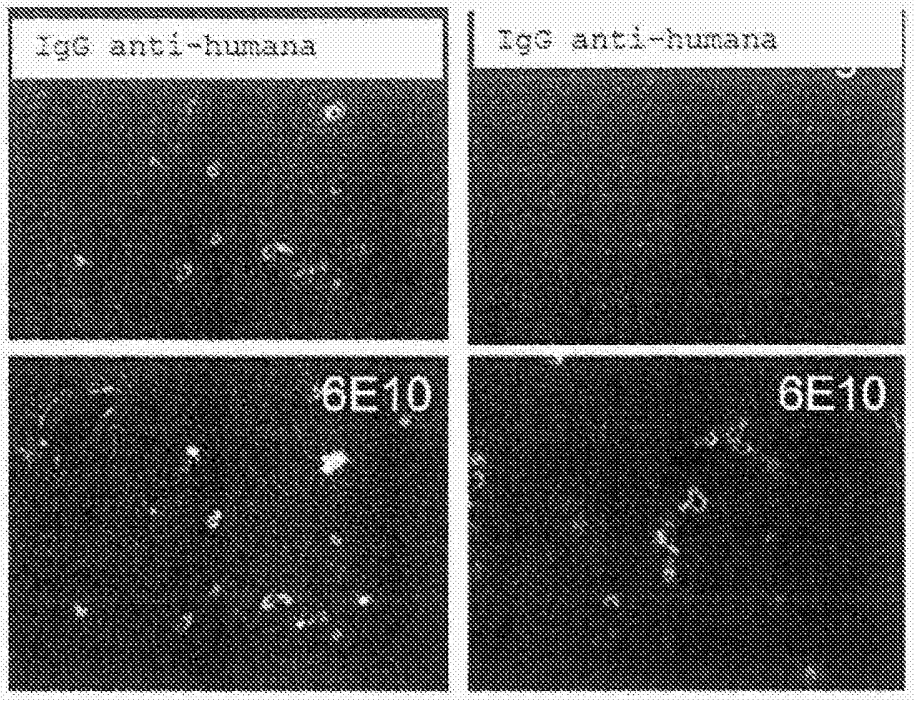


FIG. 17

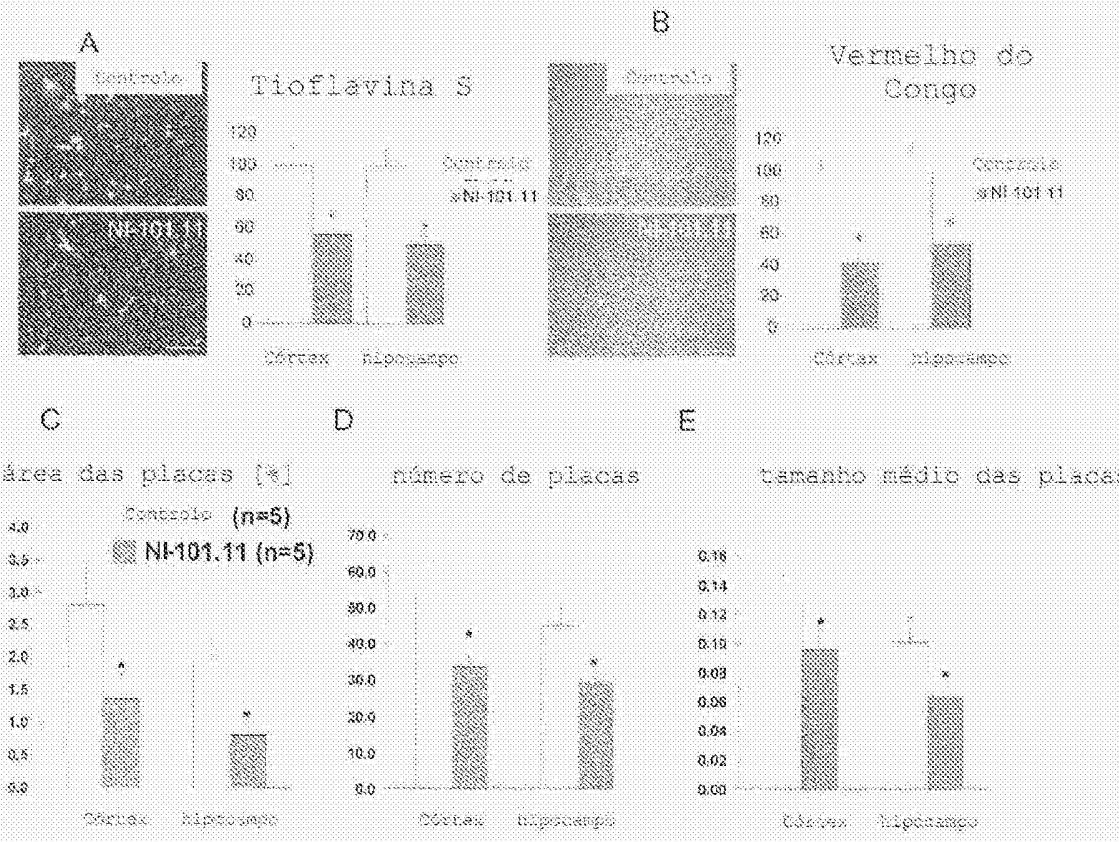


FIG. 18 A-E

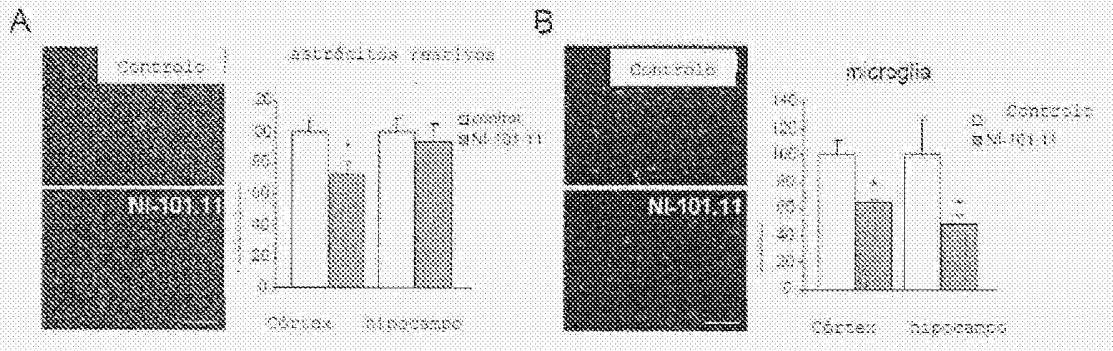


FIG. 19 A-B

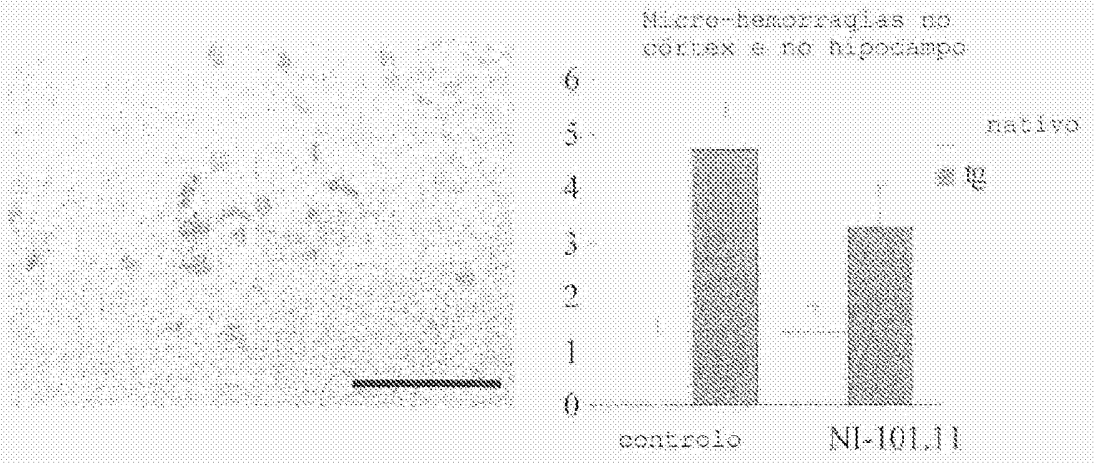

Micro-hemorragias no
córtex e no hipocampo
6
5
4
3
2
1
0
nativo
controlo
NI-101.11

FIG. 20

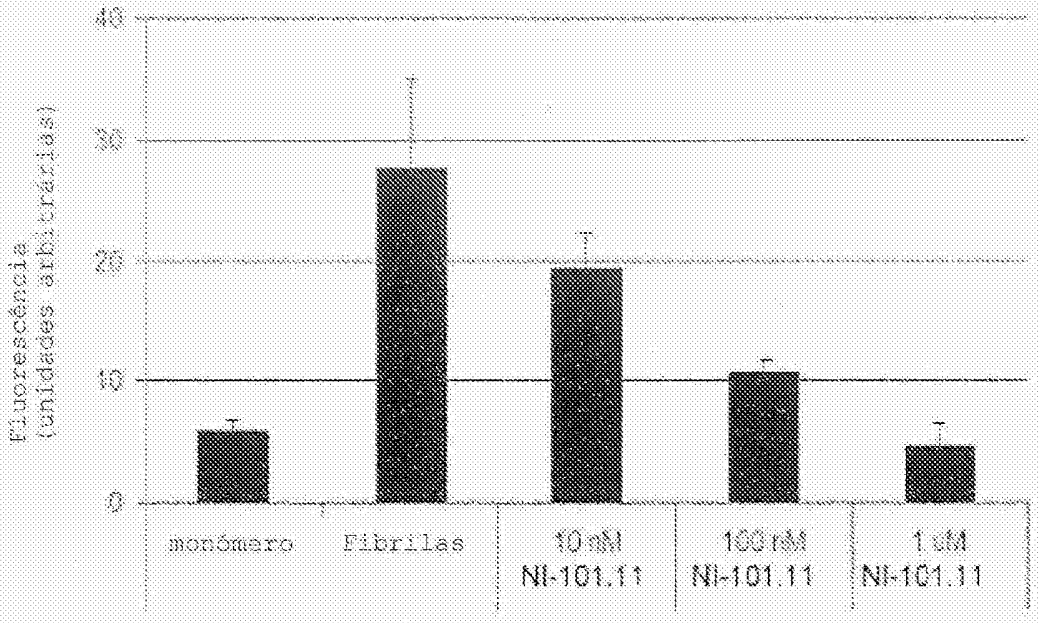

Fluorescência
(unidades arbitrárias)
40
30
20
10
0
monómero
Fibrilas
10 nM
NI-101.11
100 nM
NI-101.11
1 uM
NI-101.11

FIG. 21

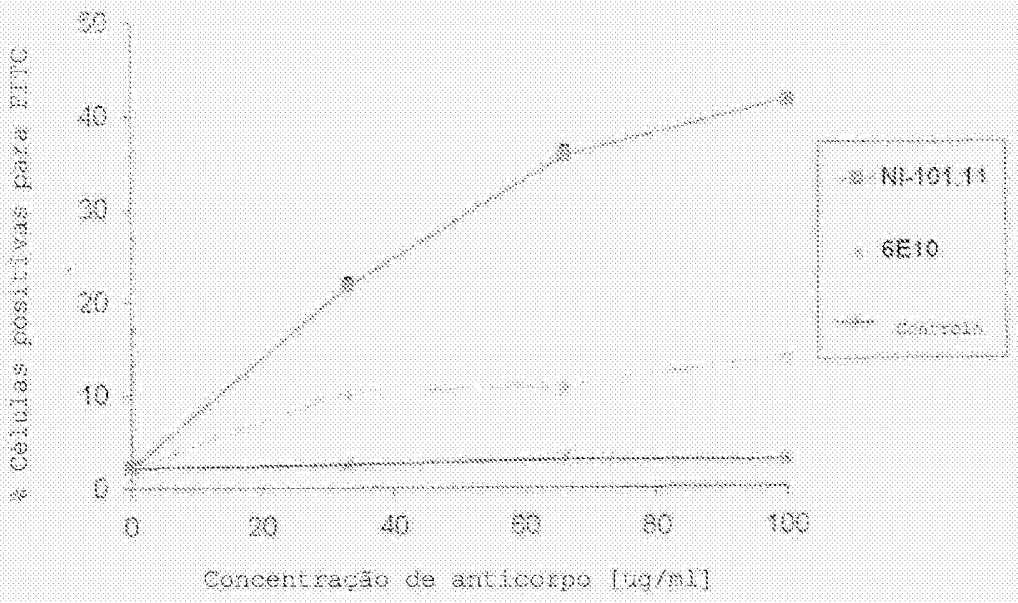

% Células positivas para FITC
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
Concentração de anticorpo [ug/ml]
NI-101.11
6E10
Controle

FIG. 22