

(22) Data de pedido: 2002.01.29	(73) Titular(es): GENENTECH, INC.	
(30) Prioridade(s): 2001.02.22 US 270775 2002.01.09 US 44896	1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO CA	US
(43) Data de publicação do pedido: 2009.06.03	(72) Inventor(es): ANAN CHUNTHARAPAI	US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.10.23 016/2014	JIN K. KIM	US
	TIMOTHY STEWART	US
	LEONARD G. PRESTA	US
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA	
	RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-INTERFERÃO Α**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO REFERE-SE GENERICAMENTE À GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IFN-**Α**; NEUTRALIZANTES COM AMPLA REACTIVIDADE CONTRA VÁRIOS SUBTIPOS DE IFN-**Α**; O INVENTO REFERE-SE AINDA À UTILIZAÇÃO DE TAIS ANTICORPOS ANTI-IFN-**Α**; NO DIAGNÓSTICO E NO TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS ASSOCIADOS A MAIOR EXPRESSÃO DE IFN-**Α**; EM PARTICULAR, DISTÚRBIOS AUTO-IMUNES TAIS COMO DIABETES MELLITUS DEPENDENTE DE INSULINA (DMDI) E LÚPUS SISTÊMICO ERITEMATOSO (LSE).

DESCRIÇÃO**"Anticorpos anti-interferão "****Antecedentes do Invento**Campo do Invento

O presente invento refere-se geralmente à geração e caracterização de anticorpos monoclonais anti-IFN- neutralizantes com ampla reactividade contra vários subtipos de IFN- . O invento refere-se ainda à utilização de tais anticorpos anti-IFN- no diagnóstico e tratamento de distúrbios associados a maior expressão de IFN- , em particular, distúrbios auto-imunes tais como diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI) e lúpus sistémico eritematoso (LSE).

Descrição da Técnica RelacionadaInterferão- (IFN-)

Embora os interferões tenham sido inicialmente descobertos pelas suas actividades antivirais, investigação subsequente revelou uma pletora de actividades reguladoras associadas a estas poderosas citocinas. Os interferões de tipo I formam uma família antiga de citocinas que inclui IFN- , IFN- , IFN- , IFN- e IFN- (Roberts *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 805-816 (1998)). São codificados por genes sem intrões e estão amplamente distribuídos entre os vertebrados. Enquanto o IFN- é codificado por um único gene nos primatas e roedores, foram verificados mais de 10 e 15 subtipos de IFN- diferentes em ratinhos e no homem, respectivamente. Outros interferões de tipo I são mais restritos, p.ex. IFN- no porco, IFN- em gado e ovelhas, e IFN- em gado e humanos. Assim, os interferões de tipo I humanos compreendem múltiplos membros da família de IFN- , e membros individuais das famílias IFN- e IFN- . Todos os IFN de tipo I parecem ligar-se a um único receptor que é constituído por pelo menos duas proteínas que atravessam a membrana. Por outro lado, os interferões de tipo II são

representados por um único membro, IFN- γ , e ligam-se a um receptor distinto.

Embora todos os tipos de IFN de tipo I, incluindo IFN- α , exibam actividades antivirais e anti-proliferativas e deste modo ajudem a controlar infecções virais e tumores (Lefevre *et al.*, *Biochimie* 80: 779-788 (1998); Horton *et al.*, *Cancer Res.* 59: 4064-4068 (1999); Alexenko *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 769-779 (1997); Gresser, *J. Leukoc. Biol.* 61: 567-574 (1997)), existem também várias doenças auto-imunes que estão associadas a maior expressão de IFN- γ , principalmente diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI) e lúpus sistémico eritematoso (LSE).

A diabetes de tipo I, também conhecida como diabetes auto-imune ou diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI), é uma doença auto-imune caracterizada pela destruição selectiva de células pancreáticas por linfócitos T auto-reactivos (Bach, *Endocr. Rev.* 15: 516-542 (1994); Castano e Eisenbarth, *Annu. Rev. Immunol.* 8: 647-679 (1990); Shehadeh e Lafferty, *Diabetes Rev.* 1: 141-151 (1993)). A patologia de DMDI é muito complexa envolvendo uma interacção entre um evento epigenético (possivelmente uma infecção viral), as células pancreáticas e o sistema imunitário num hospedeiro geneticamente susceptível. Várias citocinas, incluindo IFN- α e IFN- γ , foram implicadas na patogénese de DMDI em humanos e em modelos animais da doença (Campbell *et al.*, *J. Clin. Invest.* 87: 739-742 (1991); Huang *et al.*, *Diabetes* 44: 658-664 (1995); Rhodes e Taylor, *Diabetologia* 27: 601-603 (1984)). Por exemplo, a expressão pancreática de ARNm de *Ifn-* e a presença de IFN- γ imunorreactivo em células de pacientes com DMDI foram relatadas (Foulis *et al.*, *Lancet* 2: 1423-1427 (1987); Huang *et al.*, (1995) *supra*; Somoza *et al.*, *J. Immunol.* 153: 1360-1377 (1994)). A expressão de IFN- γ foi associada a hiper-expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I_A em ilhéus humanos (Foulis *et al.*, (1987) *supra*; Somoza *et al.*, (1994) *supra*). Em dois modelos de roedor de diabetes auto-imune, o rato DP-BB com tendência para diabetes e ratinhos tratados com estreptozotocina, a expressão de ARNm de *Ifn-* em ilhéus precede insulite e diabetes (Huang *et al.*, *Immunity* 1: 469-478 (1994)). Além disso, ratinhos transgénicos possuindo uma

construção híbrida de promotor humano da insulina-*Ifn*- desenvolvem diabetes hipoinsulinémica acompanhada de insulite (Stewart *et al.*, *Science* 260: 1942-1946 (1993)).

Parece que a expressão local de IFN- por células dos ilhéus pancreáticos em resposta a potenciais estímulos diabetogénicos tais como vírus pode desencadear o processo insulítico. Consistente com o seu papel como agente de iniciação, foi mostrado que IFN- induz a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e HLA de classe I_A em células endoteliais de ilhéus humanos, que podem contribuir para a infiltração de leucócitos durante insulite (Chakrabarti *et al.*, *J. Immunol.* 157: 522-528 (1996)). Além disso, IFN- facilita a estimulação de células T através da indução das moléculas co-estimuladoras ICAM-1 e B7.2 em células de apresentação do antígeno em ilhéus (Chakrabarti *et al.*, *Diabetes* 45: 1336-1343 (1996)). Estes estudos indicam colectivamente que a expressão inicial de IFN- por células pode ser um evento crítico na iniciação de diabetes auto-imune. Embora existam vários relatórios implicando IFN- no desenvolvimento de DMDI em modelos de roedor, existe uma fraca correlação entre a expressão desta citocina e a DMDI humana. Assim, células expressando IFN- podem ser verificadas nos ilhéus de um subconjunto de pacientes humanos seleccionados para infiltração linfocítica significativa nos ilhéus. Num grupo de pacientes que não foram seleccionados através destes critérios não houve uma associação óbvia entre a expressão de IFN- e a DMDI humana.

Com base no maior nível de expressão de IFN- em pacientes com lúpus sistémico eritematoso (LSE), IFN- foi também implicado na patogénese de LSE (Ytterberg e Schnitzer, *Arthritis Rheum.* 25: 401-406 (1982); Shi *et al.*, *Br. J. Dermatol.* 117: 155-159 (1987)). É interessante observar que IFN- é actualmente utilizado para o tratamento de cancro bem como infecção viral tal como hepatite crónica devido a infecção com o vírus da hepatite B ou hepatite C. Consistente com as observações de maiores níveis de IFN- desencadear auto-imunidade, foi relatada uma diminuição significativa no surgimento de distúrbios auto-imunes tais como DMDI, LSE e tiroidite auto-imune nos pacientes sujeitos a terapia de IFN-. Por exemplo, foi mostrado que a utilização prolongada

de IFN- γ como terapia antiviral induz DMDI (Waguri *et al.*, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 23: 33-36 (1994); Fabris *et al.*, *J. Hepatol.* 28: 514-517 (1998)) ou LES (Garcia-Porrúa *et al.*, *Clin. Exp. Rheumatol.* 16: 107-108 (1998)). O tratamento de infecção por coxsackievírus B (CBV) com terapia de IFN- γ está também associado à indução de DMDI (Chehadeh *et al.*, *J. Infect. Dis.* 181: 1929-1939 (2000)). Semelhantemente, existem múltiplos relatos de casos documentando DMDI ou LSE em pacientes de cancro tratados com IFN- γ (Ronnblom *et al.*, *J. Intern. Med.* 227: 207-210 (1990)).

Terapia de anticorpos

A utilização de anticorpos monoclonais como agentes terapêuticos tem ganho maior aceitação com vários anticorpos monoclonais (mAb) aprovados para utilização humana ou em ensaios clínicos em fase avançada. O primeiro mAb aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de rejeição de aloenxertos foi anti-CD3 (OKT3) em 1986. Desde aí o ritmo do progresso no campo de mAb foi consideravelmente acelerado, particularmente desde 1994 o que conduziu à aprovação de mais sete mAb para tratamento humano. Estes incluem ReoPro[®] para a gestão de complicações de angioplastia coronária em 1994, Zenapax[®] (anti-CD25) para a prevenção de rejeição de aloenxertos em 1997, Rituxan[®] (anti-CD20) para o tratamento de linfoma de células B não Hodgkin em 1997, Infliximab[®] (anti-TNF- α) inicialmente para o tratamento de doença de Crohn em 1998 e subsequentemente para o tratamento de artrite reumatóide em 1999, Simulect[®] (anti-CD25) para a prevenção de rejeição de aloenxertos em 1998, Synagis[®] (anti-proteína F do vírus sincicial respiratório) para o tratamento de infecções respiratórias em 1998, e Herceptin[®] (anti-HER2/neu) para o tratamento de tumores da mama metastáticos sobre-expressando HER2 em 1998 (Glennie e Johnson, *Immunol. Today* 21: 403-410 (2000)).

Anticorpos anti-IFN- γ

Estados de doença que são passíveis de intervenção com mAb incluem todos aqueles em que existe um nível patológico de um antigénio alvo. Por exemplo, um anticorpo que neutralize o IFN- γ presente no soro de pacientes com LSE, e

seja expresso pelos ilhéus pancreáticos em DMDI, é um potencial candidato para intervenção terapêutica nestas doenças. Pode também ser utilizado para intervenção terapêutica noutras doenças auto-imunes com aumento subjacente e um papel causador da expressão de IFN- γ . Tanto em DMDI humana (Foulis, et al., *Lancet* 2: 1423-1427 (1987); Huang, et al., *Diabetes* 44: 658-664 (1995); Somoza, et al., *J. Immunol.* 153: 1360-1377 (1994)) e LSE humana (Hooks, et al., *Arthritis & Rheumatism* 25: 396-400 (1982); Kim, et al., *Clin. Exp. Immunol.* 70: 562-569 (1987); Lacki, et al., *J. Med.* 28: 99-107 (1997); Robak, et al., *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 46: 375-380 (1998); Shiozawa, et al., *Arthritis & Rheumatism* 35: 417-422 (1992); von Wussow, et al., *Rheumatology International* 8: 225-230 (1988)) parece haver correlação entre a doença e IFN- γ mas não com IFN- α ou IFN- β . Assim, a intervenção de mAb anti-interferão em DMDI ou LSE requererá uma neutralização específica da maioria, se não de todos os subtipos de IFN- γ , sem qualquer neutralização significativa de IFN- α ou IFN- β . Deixando a actividade destes dois últimos interferões intacta, pode também ter uma vantagem ao permitir a retenção de uma actividade antiviral significativa.

Embora tenham sido descritos alguns mAb que mostram reactividade com uma variedade de subtipos humanos de IFN- γ recombinantes, verificou-se que estes neutralizam apenas um subconjunto limitado dos subtipos de IFN- γ recombinantes analisados ou não foram capazes de neutralizar a mistura de subtipos de IFN- γ que foram produzidos por leucócitos do sangue periférico estimulados (Tsukui et al., *Microbiol. Immunol.* 30: 1129-1139 (1986); Berg, J. *Interferon Res.* 4: 481-491 (1984); Meager e Berg, J. *Interferon Res.* 6: 729-736 (1986); Patente US N.º 4902618; e publicação EP N.º 0,139,676 B1).

Concordantemente, existe grande necessidade de anticorpos anti-IFN- γ que não só se liguem à maioria, de preferência a todos, os subtipos de IFN- γ mas também que neutralizem tais subtipos ao mesmo tempo que não interferem com a função biológica de outros interferões.

Sumário do Invento

O presente invento baseia-se no desenvolvimento de um anticorpo monoclonal que se verificou experimentalmente que neutralizava todos os sete subtipos de IFN- humano recombinantes diferentes testados e dois grupos independentes de subtipos de IFN- humano naturais.

Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo monoclonal anti-IFN- humano que se liga e neutraliza uma actividade biológica de pelo menos os subtipos de IFN- humano IFN- 1, IFN- 2, IFN- 4, IFN- 5, IFN- 8, IFN- 10 e IFN- 21, como definido nas reivindicações. O anticorpo do invento pode reduzir ou eliminar significativamente uma actividade biológica do IFN- humano em questão. O anticorpo do invento pode ser capaz de neutralizar pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, de preferência pelo menos 75%, de maior preferência pelo menos 80%, ainda de maior preferência pelo menos 85%, ainda de maior preferência pelo menos 90%, ainda de maior preferência pelo menos 95% e ainda de preferência pelo menos 99% de uma actividade biológica do IFN- humano em questão. De preferência, o anticorpo monoclonal neutralizante da actividade biológica do IFN- humano não neutraliza a actividade biológica correspondente do IFN- humano.

A actividade biológica dos IFN- humanos em questão pode ser actividade de ligação a IFNAR2. O anticorpo monoclonal anti-IFN- humano pode ser capaz de se ligar e bloquear pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, de preferência pelo menos 75%, de maior preferência pelo menos 80%, ainda de preferência pelo menos 85%, ainda de maior preferência pelo menos 90%, ainda de maior preferência pelo menos 95%, e ainda de maior preferência pelo menos 99% da actividade de ligação a IFNAR2 de todos, ou substancialmente todos, os subtipos de IFN- humano. O anticorpo monoclonal anti-IFN- humano pode ser capaz de se ligar e bloquear pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, de preferência pelo menos 75%, de maior preferência pelo menos 80%, ainda de maior preferência pelo menos 85%, ainda de maior preferência pelo menos 90%, ainda de maior preferência pelo menos 95%, e ainda de preferência pelo menos 99% da actividade de ligação a IFNAR2 de cada um dos subtipos de IFN- humano 1, 2, 4, 5, 8, 10 e 21.

A actividade biológica dos IFN- humanos em questão pode ser uma actividade antiviral. O anticorpo monoclonal anti-IFN- humano pode ser capaz de se ligar e neutralizar a actividade antiviral de todos, ou substancialmente todos, os subtipos de IFN- humano. O anticorpo monoclonal anti-IFN- humano pode ser capaz de se ligar e neutralizar a actividade antiviral de cada um dos subtipos de IFN- humano 1, 2, 4, 5, 8, 10 e 21. O anticorpo pode ser capaz de se ligar e neutralizar pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, de preferência pelo menos 75%, de maior preferência pelo menos 80%, ainda de maior preferência pelo menos 85%, ainda de maior preferência pelo menos 90%, ainda de maior preferência pelo menos 95% e ainda de preferência pelo menos 99% da actividade antiviral de todos, ou substancialmente todos, os subtipos de IFN- humano. O anticorpo pode ligar-se e neutralizar pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, ou pelo menos 75%, ou pelo menos 80%, ou pelo menos 85%, ou pelo menos 90%, ou pelo menos 95%, ou pelo menos 99% da actividade antiviral de cada um dos subtipos de IFN- humano 1, 2, 4, 5, 8, 10 e 21. De preferência, o anticorpo monoclonal neutralizante da actividade antiviral do IFN- humano não neutraliza a actividade antiviral do IFN- humano.

O anticorpo pode ser um anticorpo de murídeo, humanizado ou humano. O anticorpo pode ser o anticorpo monoclonal de murídeo anti-IFN- humano 9F3 ou uma versão humanizada deste tal como a versão 13 (V13) ou uma forma quimérica deste. O âmbito do invento cobre também um anticorpo que se liga essencialmente ao mesmo epítopo de IFN- que o anticorpo monoclonal anti-IFN- humano de murídeo 9F3 ou a uma sua forma humanizada ou quimérica. Por exemplo, um anticorpo de referência para este fim é um anticorpo anti-IFN- produzido pela linha celular de hibridoma de murídeo 9F3.18.5 depositada na ATCC a 18 de Janeiro de 2001 e possuindo o N°. de acesso PTA-2917. Noutra concretização, o invento proporciona um anticorpo monoclonal anti-IFN- humano de murídeo ou quimérico murídeo/humano compreendendo a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve de murídeo mostrada na Fig. 5A (SEQ ID NO: 1) e/ou a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada de murídeo mostrada na Fig. 5B (SEQ ID NO: 2). Ainda noutra

concretização, o invento proporciona um anticorpo monoclonal humanizado anti-IFN- humano compreendendo a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve humanizada mostrada na Fig. 5A (SEQ ID NO: 3) e/ou a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada humanizada mostrada na Fig. 5B (SEQ ID NO: 5).

O anticorpo monoclonal anti-IFN- humano pode ligar-se essencialmente aos mesmos epítomos nos subtipos de IFN- humano 1, 2, 4, 5, 8, 10 e 21 que se liga o anticorpo monoclonal anti-IFN- humano de murídeo 9F3 ou uma sua forma humanizada ou quimérica. O anticorpo monoclonal anti-IFN- humano compete com o anticorpo monoclonal anti-IFN- humano de murídeo 9F3 pela ligação a cada um dos subtipos de IFN- humano 1, 2, 4, 5, 8, 10 e 21.

É também proporcionada uma molécula de ácido nucleico isolada codificando um anticorpo como definido nas reivindicações, um vector compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada, uma célula hospedeira transformada com a molécula de ácido nucleico, e um método de produção do anticorpo compreendendo a cultura da célula hospedeira sob condições em que a molécula de ácido nucleico é expressa para produzir o anticorpo e opcionalmente a recuperação do anticorpo a partir da célula hospedeira. O anticorpo pode ser da classe e isotipos de IgG tais como IgG₁, IgG₂, IgG₃, ou IgG₄. O âmbito do invento cobre também fragmentos de anticorpo tais como os fragmentos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, e Fab'.

Neste fascículo, as CDR são tal como definidas por Kabat, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

Numa concretização, o invento proporciona, na medida em que estiver no âmbito das reivindicações, um anticorpo monoclonal anti-IFN- humano compreendendo (A) pelo menos uma cadeia leve ou um seu fragmento, compreendendo as seguintes CDR: (a) L1 com a fórmula RASQSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO: 7); (b) L2 com a fórmula YASNLES (SEQ ID NO: 8); e (c) L3 com a fórmula QHSWGIPRTF (SEQ ID NO: 9); e (B) pelo menos uma

cadeia pesada ou um seu fragmento, compreendendo as seguintes CDR: (a) H1 com a fórmula GYTFTEYIIH (SEQ ID NO: 10); (b) H2 com a fórmula SINPDYDITNYNQRFKG (SEQ ID NO: 11); e (c) H3 com a fórmula WISDFFDY (SEQ ID NO: 12). O anticorpo pode ser uma estrutura homo-tetramérica composta por dois pares de cadeias pesadas-cadeias leves de anticorpo ligadas por dissulfuretos. O âmbito do invento inclui especificamente um anticorpo linear, um anticorpo de murídeo, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano. É ainda proporcionado um anticorpo quimérico compreendendo (1) a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve quimérica ratinho/humano, ou toda a sequência de aminoácidos do polipéptido da cadeia leve quimérica, codificada pelo vector XAIFN-ChLpDR1 depositado na ATCC a 9 de Janeiro de 2001 e possuindo o N°. de acesso PTA-2880; e (2) a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada quimérica ratinho/humano, ou toda a sequência de aminoácidos do polipéptido da cadeia pesada quimérica, codificada pelo vector XAIFN-ChHpDR2 depositado na ATCC a 9 de Janeiro de 2001 e possuindo o N°. de acesso PTA-2883. É adicionalmente aqui proporcionado um anticorpo humanizado compreendendo (1) a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve humanizada, ou toda a sequência de aminoácidos do polipéptido da cadeia leve humanizada, codificada pelo vector VLV30-IgG depositado na ATCC a 9 de Janeiro de 2001 e possuindo o N°. de acesso PTA-2882; e (2) a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada humanizada, ou toda a sequência de aminoácidos do polipéptido da cadeia pesada humanizada, codificada pelo vector VHV30-IgG2 depositado na ATCC a 9 de Janeiro de 2001 e possuindo o N°. de acesso PTA-2881.

Ainda noutro aspecto, o invento proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do anticorpo do invento numa mistura com um transportador farmaceuticamente aceitável.

O anticorpo do invento pode ser utilizado num método para diagnóstico de uma condição associada à expressão de IFN- numa célula, compreendendo o contacto da célula com o anticorpo, e a detecção da presença de IFN- .

O anticorpo do invento pode ser utilizado num método para o tratamento de uma doença ou condição associada à expressão de IFN- num paciente, compreendendo a administração ao paciente de uma quantidade eficaz do anticorpo. O paciente é um paciente mamífero, de preferência um paciente humano. A doença é uma doença auto-imune, tal como diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI); lúpus sistémico eritematoso (LSE); ou tiroidite auto-imune.

Breve Descrição dos Desenhos

A Fig. 1 mostra um diagrama esquemático da estratégia utilizada para o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais anti-IFN- .

A Fig. 2 mostra que um mAb anti-IFN- humano de muídeo (9F3) é capaz de neutralizar um espectro de subtipos de IFN- recombinante mas não de IFN- recombinante. Os IFN indicados foram ensaiados quanto à inibição do crescimento viral de encefalomioscardite (EMC) em células A549 na presença de concentrações crescentes do mAb 9F3. Os dados são apresentados como a percentagem de actividade de inibição do crescimento viral obtida com o IFN indicado na ausência de mAb 9F3.

As Figs. 3A-3B mostram a neutralização de interferão de leucócitos (Sigma) (Fig. 3A) e interferão linfoblastóide (referência NIH Ga23-901-532) (Fig. 3B). Na Fig. 3A, 20000 IU/ml (barras a cheio) ou 5000 IU/ml (barras vazias) de interferão de leucócitos (Produto Sigma N.º I-2396) foram incubados com controlo branco (apenas tampão) (indicado como "-"), 10 :g/ml de IgG de ratinho de controlo (indicado como "mIgG"), ou 10 :g/ml de mAb 9F3 (indicado como "9F3"). Foram ensaiadas diluições e mostrada a quantidade de actividade restante. Os resultados mostrados são médias de determinações em duplicado. Na Fig. 3B, o interferão linfoblastóide (referência NIH Ga23-901-532) foi ensaiado a 10 (colunas a cheio) ou 3 (colunas vazias) IU/ml na presença ou ausência das concentrações indicadas do mAb 9F3. Um efeito citopático maior é indicativo de uma diminuição na actividade do interferão. Os resultados mostrados são as médias das determinações em duplicado.

A Fig. 4 representa os resultados de um ensaio de alteração da mobilidade electroforética (EMSA) mostrando a indução de um complexo ISGF3/ISRE pelo IFN- γ e a capacidade do mAb 9F3 para prevenir a formação do complexo. O EMSA foi efectuado na presença ou ausência de IFN- γ humano (indicado como " γ ") ou IFN β (indicado como " β ") a uma concentração de 25 ng/ml com mAb 9F3 (indicado como "9F3") ou anticorpo de controlo IgG de murídeo (indicado como "IgG") a uma concentração de 10 μ g/ml.

A Fig. 5A mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve do 9F3 de murídeo (murídeo, SEQ ID NO: 1), da versão 13 do 9F3 humanizada (V 13, SEQ ID NO: 3), e do domínio variável da cadeia do subgrupo I humano de consenso (hu I, SEQ ID NO: 4). As CDR (L1, SEQ ID NO: 7; L2, SEQ ID NO: 8; e L3, SEQ ID NO: 9) são realçadas através de sublinhado. A numeração dos resíduos está de acordo com Kabat et al., (1991) *supra*. As diferenças entre as sequências de 9F3 de murídeo e de V13 e as diferenças entre as sequências de 9F3 e hu I estão indicadas por asteriscos.

A Fig. 5B mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada do 9F3 de murídeo (murídeo, SEQ ID NO: 2), da versão 13 do 9F3 humanizada (V13, SEQ ID NO: 5), e do domínio variável pesado do subgrupo III humano de consenso (huIII, SEQ ID NO: 6). As CDR (H1, SEQ ID NO: 10; H2, SEQ ID NO: 11; e H3, SEQ ID NO: 12) são realçadas através de sublinhado. A numeração dos resíduos está de acordo com Kabat et al. (1991) *supra*. As diferenças entre as sequências de 9F3 de murídeo e V13 e as diferenças entre as sequências de 9F3 e huIII são indicadas por asteriscos.

A Fig. 6 mostra actividade de neutralização do mAb 9F3 de partida (painel esquerdo) e da proteína quimérica CH8-2 (painel direito) para a inibição do crescimento exibida por subtipos de IFN- γ recombinantes em células A549 provocadas com o vírus de encefalomiocardite (EMC).

A Fig. 7 representa um modelo da versão 13 de 9F3 humanizada. A estrutura dos domínios VL e VH é mostrada como uma fita. As CDR são mostradas a branco e estão marcadas (L1, L2, L3, H1, H2, H3). As cadeias laterais estruturais alteradas de humano para murídeo são mostradas a branco e estão marcadas pelo número do resíduo.

Descrição Detalhada da Concretização Preferida

A. Definições

A menos que definido de outro modo, os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que é comumente entendido por uma pessoa competente na matéria a que este invento pertence. Ver, p.ex. Singleton *et al.*, "Dictionary of Microbiology and Molecular Biology" 2ª ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Para os fins do presente invento, os seguintes termos são definidos abaixo.

Tal como aqui utilizado, o termo "interferão de tipo I" é definido para incluir todos os subtipos de interferões de tipo I de sequência nativa de qualquer espécie de mamífero, incluindo interferão- α , interferão- β , interferão- γ , interferão- δ e interferão- ϵ . Semelhantemente, o termo "interferão de tipo I humano" é definido para incluir todos os subtipos de interferões de tipo I humanos de sequência nativa, incluindo as classes de interferão- α , interferão- β e interferão- γ humanos e que se ligam a um receptor celular comum.

A menos que expressamente proporcionado de outro modo, os termos "interferão-", "IFN-", e "interferão- humano", "IFN- humano" e "hIFN-" são aqui utilizados para referir todas as espécies de interferões alfa humanos de sequência nativa, incluindo todos os subtipos de interferões- humanos de sequência nativa. O interferão- humano natural (sequência nativa) compreende 23 ou mais proteínas intimamente aparentadas codificadas por genes distintos com um elevado grau de homologia estrutural (Weissmann e Weber, *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 33: 251 (1986); *J. Interferon Res.*,

13: 443-444 (1993); Roberts *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 805-816 (1998)). O locus de IFN- humano compreende duas subfamílias. A primeira subfamília consiste em pelo menos 14 genes funcionais, não alélicos, incluindo genes codificando IFN- A (IFN- 2), IFN- B (IFN- 8), IFN- C (IFN- 10), IFN- D (IFN- 1), IFN- E (IFN- 22), IFN- F (IFN- 21), IFN- G (IFN- 5), e IFN- H (IFN- 14), e pseudogenes possuindo uma homologia de pelo menos 80%. A segunda subfamília, ₁₁ ou T, contém pelo menos 5 pseudogenes e um gene funcional (aqui indicado como "IFN- ₁₁I" ou "IFN-T") que exibe uma homologia de 70% com os genes de IFN- (Weissmann e Weber (1986) *supra*).

Tal como aqui se utilizam, os termos "primeiro receptor do interferão- humano (hIFN-)", "IFN- R", "hIFNAR1", "IFNAR1", e "cadeia de Uze" são definidos como a proteína receptora de 557 aminoácidos clonada por Uze *et al.*, *Cell*, 60: 225-234 (1990), incluindo um domínio extracelular de 409 resíduos, um domínio transmembranar de 21 resíduos, e um domínio intracelular de 100 resíduos, tal como mostrado na Fig. 5 na página 229 de Uze *et al.* São também englobados pelos termos anteriores fragmentos de IFNAR1 que contenham o domínio extracelular (ECD) (ou fragmentos do ECD) de IFNAR1.

Tal como aqui se utilizam, os termos "segundo receptor do interferão- humano (hIFN-)", "IFN- R", "hIFNAR2", "IFNAR2", e "cadeia de Novick" são definidos como a proteína receptora de 515 aminoácidos clonada por Domanski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 37: 21606-21611 (1995), incluindo um domínio extracelular de 217 resíduos, um domínio transmembranar de 21 resíduos, e um domínio intracelular de 250 resíduos, tal como mostrado na Fig. 1 na página 21608 de Domanski *et al.* São também englobados pelos termos anteriores fragmentos de IFNAR2 que contenham o domínio extracelular (ECD) (ou fragmentos do ECD) de IFNAR2, e formas solúveis de IFNAR2, tais como o ECD de IFNAR2 fundido com uma sequência de imunoglobulina, p.ex. ECD de IFNAR2-Fc de IgG tal como descrito abaixo.

O termo "sequência nativa" em ligação com o interferão de tipo I, IFN- ou qualquer outro polipéptido refere-se a um polipéptido que tem a mesma sequência de aminoácidos que um

polipéptido correspondente derivado da natureza, independentemente do seu modo de preparação. Tal polipéptido de sequência nativa pode ser isolado da natureza ou pode ser produzido através de meios recombinantes e/ou sintéticos ou quaisquer combinações destes. O termo "sequência nativa" engloba especificamente formas truncadas ou segregadas de ocorrência natural (p.ex., uma sequência do domínio extracelular), formas variantes de ocorrência natural (p.ex., formas de processamento alternativo) e variantes alélicas de ocorrência natural dos polipéptidos inteiros. A "reação em cadeia da polimerase" ou "PCR" refere-se a um procedimento ou uma técnica no qual quantidades mínimas de um pedaço específico de ácido nucleico, ARN e/ou ADN, são amplificadas tal como descrito na Patente U.S. N.º 4683195 concedida a 28 de Julho de 1987. Geralmente, é necessário que a informação da sequência das extremidades da região de interesse ou para além desta esteja disponível de modo a que possam ser desenhados iniciadores oligonucleotídicos; estes iniciadores serão idênticos ou semelhantes na sequência a cadeias opostas do molde a amplificar. Os nucleótidos do terminal 5' dos dois iniciadores podem coincidir com as extremidades do material amplificado. Pode ser utilizada PCR para amplificar sequências específicas de ARN, sequências específicas de ADN a partir de ADN genómico total, e o ADNc transcrito a partir de ARN celular total, sequências de bacteriófagos ou plasmídeos, etc. Ver geralmente Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263 (1987); Erlich, ed., "PCR Technology" (Stockton Press, NY, 1989). Tal como aqui se utiliza, a PCR é considerada ser um exemplo, mas não o único, de um método de reacção da polimerase de ácidos nucleicos para amplificação de uma amostra de teste de ácido nucleico compreendendo a utilização de um ácido nucleico conhecido como iniciador e de uma polimerase de ácido nucleico para amplificar ou gerar um pedaço específico do ácido nucleico.

"Anticorpos" (Ab) e "imunoglobulinas" (Ig) são glicoproteínas possuindo as mesmas características estruturais. Enquanto os anticorpos exibem especificidade de ligação a um antígeno específico, as imunoglobulinas incluem tanto anticorpos como outras moléculas semelhantes a anticorpos sem especificidade de antígeno. Os polipéptidos

do último tipo são, por exemplo, produzidos a níveis baixos pelo sistema linfático e a níveis maiores por mielomas.

"Anticorpos e imunoglobulinas nativos" são habitualmente glicoproteínas hetero-tetraméricas de cerca de 150 000 daltons, constituídos por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada através de uma ligação dissulfureto covalente, enquanto o número de ligações dissulfureto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulinas. Cada cadeia pesada e leve tem pontes dissulfureto intracadeias regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável (VH) seguido de vários domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável (VL) numa extremidade e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Crê-se que determinados resíduos de aminoácidos formam uma interface entre os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas (Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 186: 651 (1985); Novotny e Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4592 (1985); Chothia *et al.*, *Nature* 342: 877-883 (1989)).

O termo "variável" refere-se ao facto de certas porções dos domínios variáveis diferirem extensivamente na sequência entre os anticorpos e serem utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para o seu antigénio particular. No entanto, a variabilidade não está distribuída uniformemente ao longo dos domínios variáveis dos anticorpos. Está concentrada em três segmentos designados regiões determinantes de complementaridade (CDR) ou regiões hipervariáveis tanto em domínios variáveis das cadeias leves como das cadeias pesadas. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são designadas a estrutura (FR). Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves nativas compreendem cada um quatro regiões FR, adoptando grandemente uma configuração em folha, ligada através de três CDR, que formam voltas ligando, e nalguns casos fazendo parte da estrutura da folha. As CDR em cada cadeia são mantidas juntas, em íntima proximidade, através das regiões

FR e, com as CDR da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao antígeno dos anticorpos (ver Kabat et al. (1991) *supra*). Os domínios constantes não estão directamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, tais como participação do anticorpo em toxicidade celular dependente de anticorpos.

A digestão com papaína dos anticorpos produz dois fragmentos de ligação ao antígeno idênticos, designados fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao antígeno, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflecte a sua capacidade para cristalizar facilmente. O tratamento com pepsina produz um fragmento $F(ab')_2$ que tem dois locais de combinação com o antígeno e é ainda capaz de se ligar de forma cruzada ao antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local completo de reconhecimento e ligação ao antígeno. Numa espécie Fv de duas cadeias, esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em íntima associação não covalente. Numa espécie de Fv de cadeia simples, um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve podem ser covalentemente ligados através de um ligador peptídico flexível tal que as cadeias leve e pesada se podem associar numa estrutura "dimérica" análoga àquela numa espécie de Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDR de cada domínio variável interagem para definir um local de ligação ao antígeno à superfície do dímero VH-VL. Colectivamente, as seis CDR conferem ao anticorpo especificidade de ligação ao antígeno. No entanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDR específicas para um antígeno) tem a capacidade para reconhecer e ligar-se ao antígeno, embora a uma menor afinidade que todo o local de ligação.

O fragmento Fab contém também o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carboxilo do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região charneira do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui

para Fab' no qual o resíduo ou resíduos de cisteína dos domínios constantes possuem um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' que têm cisteínas charneira entre eles. São também conhecidas outras ligações químicas de fragmentos de anticorpo.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, designados κ e λ , com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias destas podem ainda ser divididas em subclasses (isotipos), p.ex., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Os domínios constantes das cadeias pesadas que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são designados γ , δ , ϵ , μ , e ν respectivamente. As estruturas das subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

O termo "anticorpo" inclui todas as classes e subclasses de imunoglobulinas intactas. O termo "anticorpo" cobre também fragmentos de anticorpo. O termo "anticorpo" cobre especificamente anticorpos monoclonais, incluindo clones de fragmentos de anticorpo.

"Fragmentos de anticorpo" compreende uma porção de um anticorpo intacto que contém a região de ligação ao antigénio ou variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem os fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, e Fv; diacorpos; moléculas de anticorpo de cadeia simples, incluindo moléculas Fv de cadeia simples (scFv); e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

O termo "anticorpo monoclonal" tal como aqui se utiliza refere-se a um anticorpo (ou fragmento de anticorpo) obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente

homogéneos, i.e., os anticorpos individuais constituindo a população são idênticos excepto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que possam estar presentes em menores quantidades. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único local antigénico. Além disso, em contraste com as preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que incluem tipicamente diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antigénio. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos por serem sintetizados pela cultura de hibridoma, e não serem contaminados por outras imunoglobulinas. O adjectivo "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogénea de anticorpos, e não deve ser entendido como requerendo a produção do anticorpo através de qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a utilizar de acordo com o presente invento podem ser produzidos através do método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser produzidos através de métodos de ADN recombinante (ver, p.ex. Patente U.S. N.º 4816567). Os "anticorpos monoclonais" incluem também clones de fragmentos de anticorpo contendo um local de reconhecimento e ligação ao antigénio (clones de Fv) isolados a partir de bibliotecas fágicas de anticorpos utilizando as técnicas descritas em Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por exemplo.

Os anticorpos monoclonais aqui incluem especificamente anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas) nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma determinada espécie ou pertencente a uma determinada classe ou subclasse de anticorpos, enquanto o restante da cadeia ou das cadeias é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que exibam a actividade biológica desejada (Patente U.S. N.º 4816567; para

Cabilly *et al.*; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

As formas "humanizadas" dos anticorpos não humanos (p.ex. de murídeo) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina, ou fragmentos destas (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de ligação ao antigénio dos anticorpos) que contêm uma sequência mínima derivada de uma imunoglobulina não humana. Na maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de parte ou de todas as regiões determinantes de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato, ou coelho possuindo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Nalguns casos, resíduos da região estrutural de Fv (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não se verificam no anticorpo receptor nem na CDR importada ou nas sequências estruturais. Estas modificações são feitas para refinar melhor e otimizar o desempenho do anticorpo. Em general, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente tudo de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de uma imunoglobulina humana. O anticorpo optimamente humanizado compreenderá também pelo menos uma porção de uma região constante de uma imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992) e Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000). O anticorpo humanizado inclui um anticorpo PrimatizadoTM em que a região de ligação ao antigénio do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido através da imunização de macacos com o antigénio de interesse.

Os fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia simples" ou "scFV" compreendem os domínios VH e VL do anticorpo, em que estes domínios estão presentes numa única cadeia

polipeptídica. Geralmente, o polipéptido scFv compreende ainda um ligador polipeptídico entre os domínios VH e VL que permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação ao antigénio. Para uma revisão de scFv ver Pluckthun em "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994). Dall'Acqua e Carter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 443-450 (1998), e Hudson, *Curr. Opin. Immunol.* 11: 548-557 (1999).

O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois locais de ligação ao antigénio, cujos fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável da cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (VH-VL). Através da utilização de um ligador que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois locais de ligação ao antigénio. Os diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, em EP 404097; WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com utilizações de diagnóstico ou terapêuticas do anticorpo, e podem incluir enzimas, hormonas, e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em concretizações preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso do anticorpo tal como determinado através do método de Lowry, e de maior preferência mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de uma sequência de aminoácidos N-terminal ou interna através da utilização de um sequenciador de copo giratório, ou (3) até à homogeneidade através de SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando azul de Coomassie ou, de preferência, coloração de prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não

estará presente. Vulgarmente, no entanto, o anticorpo isolado será preparado através de pelo menos um passo de purificação.

Por "anticorpo neutralizante" entenda-se uma molécula de anticorpo que é capaz de eliminar ou reduzir significativamente uma função efectora de um antigénio alvo ao qual se liga. Concordantemente, um anticorpo anti-IFN- "neutralizante" é capaz de eliminar ou reduzir significativamente uma função efectora, tal como a ligação ao receptor e/ou o desencadeamento de uma resposta celular, de IFN- .

Para os fins do presente invento, a capacidade de um anticorpo anti-IFN- para neutralizar a actividade de activação do receptor de IFN- pode ser monitorizada, por exemplo, num Ensaio de Activação do Receptor Cinase (KIRA) tal como descrito em WO 95/14930, publicado a 1 de Junho de 1995, através da medição da capacidade de um anticorpo candidato para reduzir a fosforilação da tirosina (resultante da ligação do ligando) do complexo receptor IFNAR1/R2.

Para os fins do presente invento, a capacidade dos anticorpos anti-IFN- para neutralizar o desencadeamento de uma resposta celular por IFN- é de preferência testada através da monitorização da neutralização da actividade antiviral de IFN- , tal como descrito por Kawade, *J. Interferon Res.* 1: 61-70 (1980), ou Kawade e Watanabe, *J. Interferon Res.* 4: 571-584 (1984), ou Yousefi, *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.* 83: 735-740 (1985), ou através de teste da capacidade de um anticorpo anti-IFN- para neutralizar a capacidade de IFN- para activar a ligação da molécula de sinalização, o factor 3 estimulado por interferão (ISGF3), a um oligonucleótido derivado do elemento de resposta estimulado por interferão (ISRE), num ensaio de alteração da mobilidade electroforética, tal como descrito por Kurabayashi *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 15: 6386 (1995).

Uma redução "significativa" significa uma redução de pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 70%, de preferência pelo menos cerca de 75%, de maior preferência pelo menos cerca de 80%, ainda de maior preferência pelo menos cerca de 85%, ainda de maior preferência pelo menos

cerca de 90%, ainda de maior preferência pelo menos cerca de 95% e de maior preferência pelo menos cerca de 99% de uma função efectora do antigénio alvo (p.ex. IFN-), tal como ligação ao receptor (p.ex. IFNAR2) e/ou desencadeamento de uma resposta celular. De preferência, os anticorpos "neutralizantes" tal como aqui definidos serão capazes de neutralizar pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 70%, de preferência pelo menos cerca de 75%, de maior preferência pelo menos cerca de 80%, ainda de maior preferência pelo menos cerca de 85%, ainda de maior preferência pelo menos cerca de 90%, ainda de maior preferência pelo menos cerca de 95% e de maior preferência pelo menos cerca de 99% da actividade antiviral de IFN- , tal como determinado pelo ensaio antiviral de Kawade (1980), *supra*, ou Yousefi (1985), *supra*. Noutra concretização preferida, os anticorpos "neutralizantes" aqui serão capazes de reduzir a fosforilação da tirosina, devido à ligação de IFN- , do complexo receptor IFNAR1/IFNAR2, em pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 70%, de preferência pelo menos cerca de 75%, de maior preferência pelo menos cerca de 80%; ainda de maior preferência pelo menos cerca de 85%, ainda de maior preferência pelo menos cerca de 90%, ainda de maior preferência pelo menos cerca de 95% e de maior preferência pelo menos cerca de 99%, tal como determinado no ensaio KIRA referenciado acima. Numa concretização particularmente preferida, os anticorpos anti-IFN- neutralizantes aqui serão capazes de neutralizar todos, ou substancialmente todos, os subtipos de IFN- e ão serão capazes de neutralizar IFN- . Neste contexto, o termo "substancialmente todos" significa que o anticorpo anti-IFN- neutralizante neutralizará pelo menos IFN- 1, IFN- 2, IFN- 4, IFN- 5, IFN- 8, IFN- 10, e IFN- 21.

Para os fins do presente invento, a capacidade de um anticorpo anti-IFN- para bloquear a ligação de um IFN- ao receptor é definida como a propriedades ou capacidade de uma certa concentração do anticorpo para reduzir ou eliminar a ligação de IFN- a IFNAR2 num ensaio de competição pela ligação, em comparação com o efeito de uma concentração equivalente de anticorpo de controlo irrelevante na ligação de IFN- a IFNAR2 no ensaio. De preferência, o anticorpo anti-IFN- de bloqueio reduz a ligação de IFN- a IFNAR2 em

pelo menos cerca de 50%, ou pelo menos cerca de 55%, ou pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 65%, ou pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 99%, em comparação com o anticorpo de controlo irrelevante.

Para os fins do presente invento, a capacidade de um anticorpo anti-IFN- para bloquear a ligação de IFN- a IFNAR2 pode ser determinada através de um ensaio de competição de rotina tal como o descrito em "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Por exemplo, o ensaio ELISA de ligação a IFN- descrito no Exemplo 2 abaixo pode ser modificado para empregar ligação de competição entre um anticorpo anti-IFN- e um IFNAR2 solúvel. Um tal ensaio pode ser efectuado deitando o IFN- em placas de microtitulação, incubando as placas cobertas com diluições em série de anticorpo anti-IFN- não marcado ou anticorpo de controlo não marcado misturado com uma concentração seleccionada da proteína de fusão ECD de IFNAR2-Fc de IgG humana marcada, detectando e medindo o sinal em cada uma das misturas de incubação, e depois comparando as medições do sinal exibido pelas várias diluições de anticorpo.

Numa concretização particularmente preferida, os anticorpos de bloqueio anti-IFN- aqui são capazes de bloquear a ligação a IFNAR2 de todos, ou substancialmente todos, os subtipos de IFN- e não reagirão de forma cruzada com IFN- . Neste contexto, o termo "substancialmente todo" significa que o anticorpo anti-IFN- de bloqueio bloqueia a ligação a IFNAR2 de pelo menos IFN- 1, IFN- 2, IFN- 4, IFN- 5, IFN- 8, IFN- 10, e IFN- 21. Numa concretização particularmente preferida, os anticorpos anti-IFN- de bloqueio do presente invento bloquearão a ligação a IFNAR2 de todos os subtipos de IFN- conhecidos.

O termo "epítopo" é utilizado para referir locais de ligação para anticorpos (monoclonais ou policlonais) em antígenos proteicos.

Os anticorpos que se ligam a um determinado epítopo podem ser identificados através de "mapeamento de epítopos". Existem muitos métodos conhecidos na técnica para mapeamento e caracterização da localização dos epítopos nas proteínas, incluindo resolução da estrutura cristalina de um complexo anticorpo-antigénio, ensaios de competição, ensaios de expressão de fragmentos génicos e ensaios baseados em péptidos sintéticos, tal como descrito, por exemplo, no Capítulo 11 de Harlow e Lane, "Using Antibodies, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. Os ensaios de competição são discutidos acima e abaixo. De acordo com os ensaios de expressão de fragmentos génicos, o enquadramento de leitura aberto codificando a proteína é fragmentado aleatoriamente ou através de construções genéticas específicas e é determinada a reactividade dos fragmentos expressos da proteína com o anticorpo a testar. Os fragmentos génicos podem, por exemplo, ser produzidos através de PCR e depois transcritos e traduzidos na proteína *in vitro*, na presença de aminoácidos radioactivos. A ligação do anticorpo aos fragmentos proteicos marcados radioactivamente é então determinada através de imunoprecipitação e electroforese em gel. Certos epítopos podem também ser identificados através da utilização de grandes bibliotecas de sequências peptídicas aleatórias apresentadas à superfície de partículas fágicas (bibliotecas fágicas). Alternativamente, uma biblioteca definida de fragmentos peptídicos sobreponíveis pode ser testada quanto à ligação ao anticorpo de teste em ensaios de ligação simples. A última abordagem é adequada para definir epítopos lineares de cerca de 5 a 15 aminoácidos.

Um anticorpo liga-se "essencialmente ao mesmo epítopo" que um anticorpo de referência, quando os dois anticorpos reconhecem epítopos idênticos ou estereoquimicamente sobreponíveis. Os métodos mais amplamente utilizados e rápidos para determinar de dois epítopos se ligam a epítopos idênticos ou estereoquimicamente sobreponíveis são ensaios de competição, que podem ser configurados em todos os tipos de diferentes formatos, utilizando antigénio marcado ou anticorpo marcado. Habitualmente, o antigénio é imobilizado numa placa de microtitulação de 96 poços, e a capacidade dos anticorpos não marcados para bloquear a ligação de anticorpos

marcados é medida utilizando marcadores radioactivos ou enzimáticos.

O termo aminoácido ou resíduo de aminoácido, tal como aqui se utiliza, refere-se a L-aminoácidos ou a D-aminoácidos de ocorrência natural tal como descrito mais abaixo em relação a variantes. As abreviaturas vulgarmente utilizadas de uma e três letras para aminoácidos são aqui utilizadas (Bruce Alberts *et al.*, "Molecular Biology of the Cell", Garland Publishing, Inc., New York (3d ed. 1994)).

A "percentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos" em relação às sequências polipeptídicas aqui referidas é definida como a percentagem de resíduos de aminoácidos numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos numa sequência, após alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessário, para alcançar a percentagem máxima de identidade de sequência, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação da percentagem de identidade de sequência de aminoácidos pode ser alcançado de vários modos que estão dentro da perícia na técnica, por exemplo, utilizando software de computador à disposição do público tal como o software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 ou Megalign (DNASTAR). Os peritos na especialidade podem determinar os parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar o alinhamento máximo ao longo de toda a extensão das sequências a comparar. Para os fins daqui, no entanto, os valores da % de identidade de sequência de aminoácidos são obtidos tal como descrito abaixo através da utilização do programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2. O programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2 foi autorizado por Genentech, Inc. e o seu código fonte foi apresentado com documentação do utilizador em U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde está registado com o N.º de Registo de U.S. Copyright TXU510087. O programa ALIGN-2 está à disposição do público através de Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia, e o código fonte para o programa ALIGN-2 e as instruções para a sua utilização são divulgados na Publicação de Pedido Internacional N.º WO2000/39297

publicada a 6 de Julho de 2000. O programa ALIGN-2 deve ser compilado para utilizar num sistema operativo UNIX, de preferência UNIX digital V4.0D. Todos os parâmetros de comparação de sequências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Para os fins daqui, a % de identidade da sequência de aminoácidos de uma dada sequência de aminoácidos A para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B (que pode alternativamente referida como uma dada sequência de aminoácidos A que tem ou compreende uma certa % de identidade de sequência de aminoácidos para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B) é calculada como se segue:

$$100 \text{ vezes a fracção } X/Y$$

onde X é o número de resíduos de aminoácidos registados como coincidências idênticas através do programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 nesse alinhamento do programa de A e B, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será apreciado que quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a % de identidade de sequência de aminoácidos de A para B não igualará a % de identidade de sequência de aminoácidos de B para A. A menos que especificamente afirmado de outro modo, todos os valores da % de identidade de sequência de aminoácidos aqui utilizados são obtidos tal como descrito acima utilizando o programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2. No entanto, a % de identidade de sequência de aminoácidos pode também ser determinada utilizando o programa de comparação de sequências NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997)). O programa de comparação de sequências NCBI-BLAST2 pode ser descarregado em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI-BLAST2 utiliza vários parâmetros de pesquisa, em que todos esses parâmetros de pesquisa são estabelecidos nos valores por defeito incluindo, por exemplo, "unmask = yes", "strand = all", "expected occurrences" = 10, "minimum low complexity length = 15/5", "multi-pass e-value = 0.01", "constant for multi-pass = 25", "dropoff for final gapped alignment = 25" e "scoring matrix = BLOSUM62".

Em situações onde é empregue NCBI-BLAST2 para comparações de sequências de aminoácidos, a % de identidade de sequência de aminoácidos de uma dada sequência de aminoácidos A com, ou contra, uma dada sequência de aminoácidos B (que pode ser alternativamente referida como uma dada sequência de aminoácidos A que tem ou compreende uma certa % de identidade de sequência de aminoácidos para, com, ou contra uma dada sequência de aminoácidos B) é calculada como se segue:

$$100 \text{ vezes a fracção } X/Y$$

onde X é o número de resíduos de aminoácidos registados como coincidências idênticas através do programa de alinhamento de sequências NCBI-BLAST2 nesse alinhamento do programa de A e B, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será apreciado que quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a % de identidade de sequência de aminoácidos de A para B não igualará a % de identidade de sequência de aminoácidos de B para A.

O ácido nucleico está "operativamente ligado" quando está colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, ADN para uma pré-sequência ou líder de secreção está operativamente ligado a ADN para um polipéptido se for expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou estimulador está operativamente ligado a uma sequência de codificação se afectar a transcrição da sequência; ou um local de ligação ao ribossoma está operativamente ligado a uma sequência de codificação se estiver posicionado de modo a facilitar a tradução. Geralmente, "operativamente ligado" significa que as sequências de ADN a ligar são contíguas, e, no caso de um líder de secreção, contíguas e em fase de leitura. No entanto, os estimuladores não têm de ser contíguas. A ligação é alcançada através de ligação a locais de restrição convenientes. Se tais locais não existirem, são utilizados adaptadores ou ligadores oligonucleotídicos sintéticos de acordo com a prática convencional.

O termo "estado de doença" refere-se a um estado fisiológico de uma célula ou de um mamífero inteiro no qual ocorreu uma interrupção, cessação, ou um distúrbio das funções celulares ou corporais, dos sistemas ou dos órgãos.

O termo "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade de um fármaco eficaz para tratar (incluindo prevenção) de uma doença, um distúrbio ou condições fisiológicas indesejadas num mamífero. No presente invento, uma "quantidade eficaz" de um anticorpo anti-IFN- pode reduzir, abrandar ou atrasar um distúrbio auto-imune tal como DMDI ou LSE; reduzir, prevenir ou inibir (i.e., abrandar até certo ponto e de preferência parar) o desenvolvimento de um distúrbio auto-imune tal como DMDI ou LSE; e/ou aliviar até certo ponto um ou mais dos sintomas associados a distúrbios auto-ímunes tais como DMDI ou LSE.

Nos métodos do presente invento, o termo "controlo" e variantes gramaticais deste, são utilizados para se referirem à prevenção, inibição parcial ou completa, redução, atraso ou abrandamento de um evento indesejado, p.ex. condição fisiológica, tal como a geração de células T auto-reactivas e o desenvolvimento de auto-imunidade.

"Tratamento" refere-se tanto ao tratamento terapêutico como a medidas profilácticas ou preventivas. Aqueles a necessitar de tratamento incluem aqueles já com o distúrbio bem como aqueles com tendência a ter o distúrbio ou aqueles nos quais se pretende prevenir o distúrbio. Para fins deste invento, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não se limitam a, alívio dos sintomas, diminuição da extensão da doença, estado de doença estabilizado (i.e. sem agravamento), atraso ou abrandamento da progressão da doença, melhoria ou palição do estado de doença, e remissão (parcial ou total), detectável ou indetectável. "Tratamento" pode também significar prolongamento da sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada se não receber tratamento. Aqueles a necessitar de tratamento incluem aqueles já com a condição ou o distúrbio bem como aqueles com tendência a ter a condição ou o distúrbio ou aqueles nos quais se pretende prevenir a condição ou o distúrbio.

Transportadores, excipientes ou estabilizadores "farmaceuticamente aceitáveis" são os que não são tóxicos para a célula ou o mamífero a ser exposto a estes nas dosagens e concentrações empregues. Frequentemente o transportador fisiológico aceitável é uma solução aquosa de pH tamponado. Exemplos de transportadores fisiologicamente aceitáveis incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; álcoois de açúcar tais como manitol ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como Tween™, polietilenoglicol (PEG), e Pluronic™.

"Mamífero" para fins de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de quinta, e animais de zoológico, desporto ou estimação tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. De preferência, o mamífero é humano.

B. Métodos para a realização do invento

1. Geração de Anticorpos

(i) *Anticorpos policlonais*

Os métodos para preparação de anticorpos policlonais são conhecidos na arte. Os anticorpos policlonais podem ser criados num mamífero, por exemplo, através de uma ou mais injeções de um agente imunizante e, se desejado, um adjuvante. Tipicamente, o agente imunizante e/ou adjuvante serão injectados no mamífero através de múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais. Pode ser útil conjugar o agente imunizante com uma proteína que se saiba ser imunogénica no mamífero a imunizar, tal como albumina do soro, ou inibidor da tripsina de soja. Exemplos de adjuvantes

que podem ser empregues incluem adjuvante completo de Freund e MPL-TDM.

Noutra concretização preferida, os animais são imunizados com uma mistura de vários, de preferência todos, os subtipos de IFN- para gerar anticorpos anti-IFN- com ampla reactividade contra subtipos de IFN- . Noutra concretização preferida, os animais são imunizados com a mistura de subtipos de IFN- humano que está presente nos interferões linfoblastóides humanos segregados por células de linfoma de Burkitt (células Namalva) induzidas com vírus Sendai, tal como descrito no Exemplo 1 abaixo. Uma preparação adequada de tais interferões linfoblastóides humanos pode ser obtida comercialmente (Produto N.º I-9887) a partir de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

(ii) Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando o método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler et al., *Nature* 256: 495 (1975), ou podem ser produzidos através de métodos de ADN recombinante (Patente U.S. N.º 4816567).

No método de hibridoma, um ratinho ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster ou macaco, é imunizado tal como acima descrito para desencadear linfócitos que produzam ou sejam capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", págs. 59-103, (Academic Press, 1996)).

As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e criadas num meio de cultura adequado que contém de preferência uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais, não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não possuírem a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-

transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), substâncias que previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

Células de mieloma preferidas são as que se fundem eficientemente, suportam uma produção de anticorpos estável de elevado nível através das células produtoras de anticorpos seleccionadas e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Entre estas, linhas celulares de mieloma preferidas são linhas de mieloma de murídeo, tais como as derivadas de tumores de ratinho MOP-21 e MC-11 disponíveis em Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EUA, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis em American Tipo Culture Collection, Rockville, Maryland, EUA. foram também descritas linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, "Antibody monoclonal Production Techniques and Applications", págs. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma são criadas é ensaiado quanto à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio. De preferência, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos através das células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou através de ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunossorvente ligado a enzimas (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada através de análise de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107: 220 (1980).

Após serem identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou actividade desejadas, as células podem ser subclonadas através de procedimentos de diluição limitante e criadas através de métodos padrão (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", págs. 59-103, Academic Press, 1996). Meios de cultura adequados para este fim incluem, por

exemplo, meio DMEM ou RPMI-1640. Adicionalmente, as células de hibridoma podem ser criadas *in vivo* como tumores de ascites num animal.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados a partir do meio de cultura, fluido de ascites, ou soro através de procedimentos de purificação de imunoglobulinas convencionais tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia em hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise, ou cromatografia de afinidade.

O ADN codificando os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (p.ex., através de utilização de sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesadas e leves dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como fonte preferida de tal ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que de outro modo não produzem proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O ADN pode também ser modificado, por exemplo, através da substituição da sequência de codificação para os domínios constantes das cadeias pesadas e leves humanas no lugar das sequências de murídeo homólogas (Morrison, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 6851 (1984)), ou através de união covalente à sequência de codificação da imunoglobulina ou parte da sequência de codificação para um polipéptido sem ser imunoglobulina. Desse modo, são preparados anticorpos "quiméricos" ou "híbridos" que têm a especificidade de ligação de um anticorpo monoclonal anti-IFN- γ aqui.

Tipicamente tais polipéptidos não imunoglobulina substituem domínios constantes de um anticorpo do invento, ou substituem os domínios variáveis de um local de combinação com o antigénio de um anticorpo do invento para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um local de combinação com o antigénio possuindo especificidade para um

IFN- e outro local de combinação com o antígeno possuindo especificidade para um antígeno diferente.

Anticorpos quiméricos ou híbridos podem também ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos em química proteica sintética, incluindo aqueles envolvendo agentes de reticulação. Por exemplo, podem ser construídas imunotoxinas utilizando uma reacção de permuta de dissulfuretos ou através da formação de uma ligação tioéter. Exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato.

A produção recombinante de anticorpos será descrita em mais detalhe abaixo.

(iii) Anticorpos humanizados

Geralmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos nele de uma fonte não humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente referidos como resíduos de "importação", que são tipicamente tomados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colegas através da substituição de CDR ou sequências de CDR humanas pelas sequências correspondentes de um anticorpo de roedor (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534-1536 (1988)); revisto em Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000)).

Concordantemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Cabilly, *supra*), em que substancialmente menos que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedores.

É importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de elevada afinidade para o antígeno e outras

propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar este objectivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados através de um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceptuais utilizando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos tridimensionais de imunoglobulinas estão vulgarmente disponíveis e são familiares dos peritos na especialidade. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e apresentam as estruturas conformacionais tridimensionais prováveis das sequências de imunoglobulina candidatas seleccionadas. A inspecção destas apresentações permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, i.e. a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata para se ligar ao seu antigénio. Deste modo, resíduos de FR podem ser seleccionados e combinados a partir da sequência de consenso e importação de modo a que a característica desejada do anticorpo, tal como maior afinidade para o antigénio ou antigénios alvo, seja alcançada. Em general, os resíduos de CDR estão directamente e muito substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antigénio. Para mais detalhes, ver Patente U.S. N.º 5821337.

(iv) Anticorpos humanos

Tentativas para utilizar a mesma tecnologia para gerar mAb humanos foram dificultadas pela falta de uma linha celular de mieloma humano adequada. Os melhores resultados foram obtidos utilizando heteromielomas (mielomas híbridos rato × humano) como parceiros de fusão (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur, *et al.*, "Antibodies Monoclonal Production Techniques and Applications", págs. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987). Alternativamente, células secretoras de anticorpos humanos podem ser imortalizadas através de infecção com o vírus de Epstein-Barr (EBV). No entanto, as células infectadas com EBV são difíceis de clonar e produzem habitualmente apenas rendimentos relativamente baixos de imunoglobulina (James e Bell, *J. Immunol. Methods* 100: 5-40 (1987)). No futuro, a imortalização de células B humanas pode ser possivelmente alcançada através da introdução de uma combinação definida de

genes transformantes. Uma tal possibilidade é realçada através de uma demonstração recente de que a expressão da subunidade catalítica da telomerase juntamente com a oncoproteína T grande de SV40 e um alelo oncogénico de H-ras resultava na conversão tumorigénica de células epiteliais e fibroblastos humanos normais (Hahn *et al.*, *Nature* 400: 464-468 (1999)).

É agora possível produzir animais transgénicos (p.ex. ratinhos) que sejam capazes, após imunização, de produzir um repertório de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulinas endógenas (Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Lonberg e Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995); Fishwild *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Mendez *et al.*, *Nat. Genet.* 15: 146-156 (1997); Green, *J. Immunol. Methods* 231: 11-23 (1999); Tomizuka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 (2000); revisto em Little *et al.*, *Immunol. Today* 21: 364-370 (2000)). Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de união (J_H) da cadeia pesada de anticorpos em ratinhos quiméricos e mutantes da linha germinativa resulta em completa inibição da produção de anticorpos endógenos (Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-2555 (1993)). A transferência da série génica de imunoglobulina da linha germinativa humana em tal ratinho mutante da linha germinativa resulta na produção de anticorpos humanos após provocação com o antigénio (Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993)).

Mendez *et al.* (*Nature Genetics* 15: 146-156 (1997)) geraram uma linha de ratinhos transgénicos designada "XenoMouse[®] II" que, quando provocada com um antigénio, gera anticorpos totalmente humanos de elevada afinidade. Isto foi alcançado através de integração na linha germinativa dos loci de megabases da cadeia pesada e da cadeia leve humanas em ratinhos com deleção no segmento J_H endógeno tal como descrito acima. O XenoMouse[®] II possui 1020 kb do locus da cadeia pesada humana contendo aproximadamente 66 genes de V_H , as regiões completas D_H e J_H e três regiões constantes diferentes (μ , δ e ϵ), e possui também 800 kb do locus humano contendo 32 genes de V_L , segmentos de J_L e genes de C_L . Os anticorpos produzidos nestes ratinhos assemelham-se

muito aos observados em humanos em todos os aspectos, incluindo rearranjo génico, montagem, e repertório. Os anticorpos humanos são expressos de preferência por cima dos anticorpos endógenos devido à deleção no segmento J_H endógeno que impede o rearranjo génico no locus de murídeo.

Tomizuka *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 (2000)) descreveram recentemente a geração de ratinhos duplos trans-cromossómicos (Tc) através da introdução de dois fragmentos de cromossomas humanos individuais (hCFs), um contendo todo o locus da cadeia pesada de Ig (*IgH*, ~1,5 Mb) e o outro todo o locus da cadeia leve *Ig* , ~2 Mb) numa estirpe de ratinho cujos loci endógenos *IgH* e *Ig* foram inactivados. Estes ratinhos montaram uma resposta de anticorpos humanos específica do antigénio na ausência de anticorpos de ratinho. A tecnologia de Tc pode permitir a humanização de loci complexos ou de grupo de genes de tamanho superior a megabases (tais como aqueles codificando receptores de células T, complexo de histocompatibilidade principal, grupo P450, etc.) em ratinhos ou outros animais. Outra vantagem do método é a eliminação da necessidade de clonar os loci grandes. Esta é uma vantagem significativa uma vez que a clonagem de fragmentos de ADN de tamanho superior a megabases englobando loci de Ig inteiros permanece difícil mesmo com a utilização de cromossomas artificiais de levedura (Peterson *et al.*, *Trends Genet.* 13: 61-66 (1997); Jacobovits, *Curr. Biol.* 4: 761-763 (1994)). Além disso, sabe-se que a região constante do locus *IgH* humano contém sequências difíceis de clonar (Kang e Cox, *Genomics* 35: 189-195 (1996)).

Alternativamente, pode ser utilizada tecnologia de apresentação fágica para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo *in vitro*, a partir de repertórios de genes do domínio variável (V) de imunoglobulina de dadores não imunizados (McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 (1990); revisto em Kipriyanov e Little, *Mol. Biotechnol.* 12: 173-201 (1999); Hoogenboom e Chames, *Immunol. Today* 21: 371-378 (2000)). De acordo com esta técnica, os genes do domínio V dos anticorpos são clonados enquadrados num gene de uma proteína de revestimento principal ou menor de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e apresentados como fragmentos funcionais de anticorpo à superfície da

partícula fágica. Como a partícula filamentosa contém uma cópia de ADN de cadeia simples do genoma fágico, selecções com base nas propriedades funcionais do anticorpo resultam também na selecção do gene codificando o anticorpo exibindo estas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades das células B. A apresentação fágica pode ser efectuada numa variedade de formatos (revisto em Johnson e Chiswell, "Current Opinion in Structural Biology" 3: 564-571 (1993)); Winter *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994); Dall'Acqua e Carter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 443-450 (1998); Hoogenboom e Chames, *Immunol. Today* 21: 371-378 (2000)). Várias fontes de segmentos de genes de V podem ser utilizadas para apresentação fágica. Clackson *et al.*, (*Nature* 352: 624-628 (1991)) isolaram uma gama diversificada de anticorpos anti-oxazolona a partir de uma pequena biblioteca combinatória aleatória de genes de V derivados dos baços de ratinhos imunizados. Pode ser construído um repertório de genes de V de dadores humanos não imunizados e anticorpos para uma gama diversificada de antigénios (incluindo auto-antigénios) podem ser isolados seguindo, essencialmente, as técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), ou Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Numa resposta imunitária natural, os genes de anticorpos acumulam mutações a uma elevada taxa (hipermutação somática). Algumas das mudanças introduzidas conferirão uma afinidade mais elevada, e células B apresentando imunoglobulina de superfície de elevada afinidade são preferencialmente replicadas e diferenciadas durante a subsequente provocação com o antigénio. Este processo natural pode ser imitado através do emprego da técnica conhecida como "baralhamento de cadeias" (Marks *et al.*, *Bio/Technol.* 10: 779-783 (1992)). Neste método, a afinidade dos anticorpos humanos "primários" obtidos através de apresentação fágica pode ser melhorada através da substituição sequencial dos genes da região V das cadeias pesadas e leves com repertórios de variantes de ocorrência natural (repertórios) de genes do domínio V obtidos a partir de dadores não imunizados. Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpo com afinidades no intervalo de nM. Uma estratégia para a produção de repertórios de anticorpos fágicos muito grandes (também conhecida como "a mãe de todas as bibliotecas") foi descrita

por Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993), e o isolamento de um anticorpo humano de elevada afinidade directamente a partir de tal biblioteca fágica grande é relatado por Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 13: 3245-3260 (1994). O baralhamento de genes pode também ser utilizado para derivar anticorpos humanos a partir de anticorpos de roedor, onde o anticorpo humano tem afinidades e especificidades semelhantes ao anticorpo de roedor de partida. De acordo com este método, que é também referido como "*imprinting*" de epítomos, o gene do domínio V das cadeias pesadas ou leves de anticorpos de roedor obtidos através da técnica de apresentação fágica é substituído com um repertório de genes do domínio V humano, criando quimeras roedor-humano. A selecção no antigénio resulta no isolamento da variável humana capaz de restaurar um local de ligação ao antigénio funcional, i.e. o epítomo governa (*imprints*) a escolha do parceiro. Quando o processo é repetido para substituir o domínio V de roedor restante, obtém-se um anticorpo humano (ver pedido de patente PCT WO 93/06213, publicado a 1 de Abril de 1993). Ao contrário da humanização tradicional de anticorpos de roedor através de enxerto de CDR, esta técnica proporciona anticorpos completamente humanos, que não têm resíduos estruturais nem de CDR de origem em roedor.

(v) Anticorpos *biespecíficos*

Anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, de preferência humanos ou humanizados, que têm especificidades de ligação para pelo menos dois antigénios diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para um IFN- para proporcionar um anticorpo neutralizante, a outra é para qualquer outro antigénio.

Os métodos para produzir anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é baseada na co-expressão de dois pares de cadeias pesadas-cadeias leves de imunoglobulina, onde as duas cadeias pesadas têm diferentes especificidades (Millstein e Cuello, *Nature* 305: 537-539 (1983)). Devido à escolha aleatória das cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo

diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta, que é habitualmente feita através de passos de cromatografia de afinidade, é bastante laboriosa, e os rendimentos em produto são baixos. Procedimentos semelhantes são divulgados na publicação do pedido PCT N.º WO 93/08829 (publicado a 13 de Maio de 1993), e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente e mais preferida, os domínios variáveis dos anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação anticorpo-antígeno) são fundidos com sequências dos domínios constantes de imunoglobulina. A fusão é, de preferência, com um domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões charneira, CH2 e CH3. É preferível ter a primeira região constante da cadeia pesada (CH1) contendo o local necessário para ligação à cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. Os ADN codificando as fusões de cadeias pesadas de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vectores de expressão separados, e são co-transfectados para um organismo hospedeiro adequado. Isto proporciona maior flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos polipeptídicos em concretizações quando razões desiguais das três cadeias polipeptídicas utilizadas na construção proporcionam os rendimentos óptimos. É, no entanto, possível inserir as sequências de codificação para duas ou todas as três cadeias polipeptídicas num vector de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em razões iguais resulta em rendimentos mais elevados ou quando as razões não têm particular significância. Numa concretização preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são constituídos por uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação num braço, e um par híbrido de cadeias pesadas-cadeias leves de imunoglobulina (proporcionando uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Verificou-se que esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado a partir de combinações de cadeias de imunoglobulina indesejadas, uma vez que a presença de uma cadeia leve de

imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífica proporciona um modo fácil de separação.

Para mais detalhes da geração de anticorpos biespecíficos ver, por exemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986):

(vi) *Anticorpos heteroconjugados*

Os anticorpos heteroconjugados estão também dentro do âmbito do presente invento. Os anticorpos heteroconjugados são constituídos por dois anticorpos covalentemente unidos. Tais anticorpos têm, por exemplo, sido propostos para dirigir células do sistema imunitário para células indesejadas (Patente U.S. N.º 4676980), e para tratamento de infecção de HIV (publicações de pedidos PCT Nos. WO 91/00360 e WO 92/200373; EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser produzidos utilizando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Os agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica, e são divulgados na Patente U.S. N.º 4676980, juntamente com várias técnicas de reticulação.

(vii) *Fragmentos de anticorpo*

Em certas concretizações, o anticorpo anti-IFN-neutralizante (incluindo anticorpos de murídeo, humanos e humanizados, e variantes de anticorpo) é um fragmento de anticorpo. Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos eram derivados através de digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, p.ex., Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Methods* 24: 107-117 (1992) e Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985)). No entanto, estes fragmentos podem agora ser produzidos directamente através de células hospedeiras recombinantes (revisto em Hudson, *Curr. Opin. Immunol.* 11: 548-557 (1999); Little et al., *Immunol. Today* 21: 364-370 (2000)). Por exemplo, os fragmentos Fab'-SH podem ser directamente recuperados a partir de *E. coli* e quimicamente ligados para formarem fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Noutra concretização, o F(ab')₂ é formado utilizando o fecho de leucina GCN4 para promover a montagem da molécula F(ab')₂. De acordo com outra abordagem, os fragmentos Fv, Fab ou F(ab')₂ podem ser

isolados directamente a partir de cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para os técnicos especializados.

(viii) Variantes da sequência de aminoácidos de anticorpos

Está contemplada a modificação ou modificações de sequências de aminoácidos dos anticorpos anti-IFN- γ aqui descritos. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. As variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo anti-IFN- γ são preparadas através da introdução de alterações nucleotídicas apropriadas no ácido nucleico codificando as cadeias dos anticorpos anti-IFN- γ , ou através de síntese peptídica. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções, e/ou inserções e/ou substituições de resíduos dentro das sequências de aminoácidos do anticorpo anti-IFN- γ . Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é feita para chegar à construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As mudanças de aminoácidos podem também alterar processos pós-tradução do anticorpo anti-IFN- γ , tais como alteração do número ou da posição de locais de glicosilação.

Um método útil para a identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo anti-IFN- γ neutralizante que são localizações preferidas para mutagenese é designado "mutagenese de varrimento de alaninas", tal como descrito por Cunningham e Wells *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Aqui, é identificado um resíduo ou grupo de resíduos alvo (p.ex., resíduos com carga tais como arg, asp, his, lys, e glu) que é substituído por um aminoácido neutro ou com carga negativa (de preferência alanina ou polialanina) para afectar a interacção dos aminoácidos com o antigénio. As localizações dos aminoácidos demonstrando sensibilidade funcional às substituições são então refinadas através da introdução de mais ou de outras variantes nos locais, ou para os locais, de substituição. Assim, embora o local para introdução de uma variação na sequência de aminoácidos seja predeterminado, a natureza da mutação *per se* não necessita ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação num

dado local, a mutagénese de varrimento de ala ou aleatória é conduzida no codão ou na região alvo e as variantes do anticorpo anti-IFN- expressas são pesquisadas quanto à actividade desejada.

Inserções na sequência de aminoácidos incluem fusões amino-terminais e/ou carboxi-terminais variando no comprimento de um resíduo a polipéptidos contendo uma centena de resíduos ou mais, bem como inserções intra-sequências de um ou múltiplos resíduos de aminoácidos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo anti-IFN- neutralizante com um resíduo metionilo N-terminal ou o anticorpo fundido com um marcador epitópico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo anti-IFN- incluem a fusão ao terminal N ou C do anticorpo de uma enzima ou um polipéptido que aumente a semivida sérica do anticorpo.

Outro tipo de variantes é uma variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo anti-IFN- neutralizante removido e um resíduo diferente inserido no seu lugar. Os locais de maior interesse para a mutagénese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas estão igualmente contempladas alterações em FR. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 1 sob o título de "substituições preferidas". Se tais substituições resultarem numa mudança na actividade biológica, então mais alterações substanciais, denominadas "substituições exemplares" na Tabela 1, ou tal como melhor descrito abaixo em referência às classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos pesquisados.

Tabela 1

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são alcançadas através de selecção das substituições que diferem significativamente no seu efeito na manutenção (a) da estrutura do esqueleto polipeptídico na área da substituição, por exemplo, como uma conformação de folha ou helicoidal, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no local alvo, ou (c) do volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base em propriedades comuns das cadeias laterais:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: gly, pro; e

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Substituições não conservativas implicarão a troca de um membro de uma destas classes por outro de outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da configuração correcta do anticorpo anti-IFN-neutralizante pode também ser substituído, geralmente com serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e impedir reticulação aberrante. Reciprocamente, uma ligação ou ligações de cisteína podem ser adicionadas ao anticorpo para melhorar a sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

Um tipo particularmente preferido de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo original (p.ex. um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, a variante ou variantes resultantes seleccionadas para mais desenvolvimento terão melhores propriedades biológicas relativamente ao anticorpo original a partir do qual são geradas. Um modo conveniente para geração de tais variantes de substituição é a maturação de afinidade utilizando apresentação fágica. Resumidamente, vários locais da região hipervariável (p.ex. 6-7 locais) são mutados para gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis em cada local. As variantes de anticorpo assim geradas são apresentadas de um modo monovalente a partir de partículas fágicas filamentosas como fusões com o produto do gene III de M13 empacotadas dentro de cada partícula. As variantes apresentadas por fagos são então pesquisadas quanto à sua actividade biológica (p.ex. actividade antagonista) tal como aqui divulgado. Para identificar locais de regiões hipervariáveis candidatas para modificação, pode ser efectuada mutagénese de varrimento de alaninas para identificar resíduos de regiões hipervariáveis contribuindo significativamente para a ligação ao antigénio. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo antigénio-anticorpo para identificar pontos de contacto entre o anticorpo e IFN-. Tais resíduos de contacto e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as

técnicas aqui elaboradas. Uma vez geradas tais variantes, o painel de variantes é sujeito a pesquisa tal como aqui descrito e os anticorpos com propriedades superiores num ou mais ensaios relevantes podem ser seleccionados para mais desenvolvimento.

(ix) *Variantes de glicosilação*

Os anticorpos são glicosilados em posições conservadas nas suas regiões constantes (Jefferis e Lund, *Chem. Immunol.* 65: 111-128 (1997); Wright e Morrison, *Trends Biotechnol.* 15: 26-32 (1997)). As cadeias laterais oligossacarídicas das imunoglobulinas afectam a função da proteína (Boyd et al., *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318 (1996); Wittwe e Howard, *Biochem.* 29: 4175-4180 (1990)), e a interacção intramolecular entre porções da glicoproteína que pode afectar a conformação e a superfície tridimensional apresentada da glicoproteína (Jefferis e Lund, *supra*; Wyss e Wagner, *Current Opin. Biotech.* 7: 409-416 (1996)). Os oligossacáridos podem também servir para dirigir uma dada glicoproteína para certas moléculas com base em estruturas específicas de reconhecimento. Por exemplo, foi relatado que em IgG agalactosilada, a porção oligossacarídica "salta" para fora do espaço inter-CH2 e os resíduos N-acetilglucosamina terminais ficam disponíveis para se ligarem à proteína de ligação à manose (Malhotra et al., *Nature Med.* 1: 237-243 (1995)). A remoção através de glicopeptidase dos oligossacáridos de CAMPATH-1H (um anticorpo IgG1 monoclonal de murídeo humanizado recombinante que reconhece o antígeno CDw52 de linfócitos humanos) produzido em células de ovário de hamster chinês (CHO) resultou numa redução completa na lise mediada pelo complemento (CMCL) (Boyd et al., *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318 (1996)), enquanto a remoção selectiva de resíduos de ácido siálico utilizando neuraminidase não resultou em perda de DMCL. Foi também relatado que a glicosilação de anticorpos afecta a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Em particular, foi relatado que as células CHO com expressão regulada por tetraciclina de (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII), uma glicosiltransferase catalisando a formação de GlcNAc de bissecção, têm melhor actividade de ADCC (Umana et al., *Nature Biotech.* 17: 176-180 (1999)).

A glicosilação de anticorpos é tipicamente ligada em N ou ligada em O. Ligada em N refere-se à união da porção hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido excepto prolina, são as sequências de reconhecimento para união enzimática da porção hidrato de carbono à cadeia lateral da asparagina. Assim, a presença destas sequências tripeptídicas num polipéptido cria um potencial local de glicosilação. A glicosilação ligada em O refere-se à união de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um hidroxiaminoácido, muito vulgarmente serina ou treonina, embora também possam ser utilizados 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

Variantes de glicosilação dos anticorpos são variantes nas quais o padrão de glicosilação de um anticorpo é alterado. Por alteração entenda-se a deleção de uma ou mais porções hidrato de carbono verificadas no anticorpo, adição de uma ou mais porções hidrato de carbono ao anticorpo, alteração da composição da glicosilação (padrão de glicosilação), extensão da glicosilação, etc.

A adição de locais de glicosilação ao anticorpo é convenientemente alcançada através da alteração da sequência de aminoácidos de modo a conter uma ou mais das sequências tripeptídicas acima descritas (para locais de glicosilação ligada em N). A alteração pode também ser feita através da adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para locais de glicosilação ligada em O). Semelhantemente, a remoção de locais de glicosilação pode ser alcançada através da alteração de aminoácidos dentro dos locais de glicosilação nativos do anticorpo.

A sequência de aminoácidos é habitualmente alterada através da alteração da sequência de ácido nucleico subjacente. Moléculas de ácido nucleico codificando variantes da sequência de aminoácidos do anticorpo anti-IFN- α são preparadas através de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não se limitam a, o

isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes da sequência de aminoácidos de ocorrência natural) ou preparação através de mutagénese mediada por oligonucleótidos (ou dirigida ao local), mutagénese por PCR, e mutagénese de cassete de uma variante preparada anteriormente ou de uma versão não variante do anticorpo anti-IFN- .

A glicosilação (incluindo o padrão de glicosilação) de anticorpos pode também ser alterada sem alteração da sequência de aminoácidos ou da sequência nucleotídica subjacente. A glicosilação depende grandemente da célula hospedeira utilizada para expressar o anticorpo. Uma vez que o tipo celular utilizado para expressão de glicoproteínas recombinantes, p.ex. anticorpos, como potenciais agentes terapêuticos é raramente a célula nativa, podem-se esperar variações significativas no padrão de glicosilação dos anticorpos (ver, p.ex. Hse et al., *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070 (1997)). Além da escolha das células hospedeiras, factores que afectam a glicosilação durante a produção recombinante de anticorpos incluem o modo de crescimento, a formulação do meio, a densidade da cultura, a oxigenação, o pH, os esquemas de purificação e semelhantes. Foram propostos vários métodos para alterar o padrão de glicosilação alcançado num determinado organismo hospedeiro incluindo a introdução ou sobre-expressão de certas enzimas envolvidas na produção de oligossacáridos (Patentes U.S. Nos. 5047335; 5510261 e 5278299). A glicosilação, ou certos tipos de glicosilação, podem ser enzimaticamente removidos da glicoproteína, por exemplo utilizando endoglicosidase H (Endo H). Adicionalmente, a célula hospedeira recombinante pode ser geneticamente modificada, p.ex. tornada deficiente no processamento de certos tipos de polissacáridos. Estas e técnicas semelhantes são bem conhecidas na técnica.

A estrutura de glicosilação dos anticorpos pode ser facilmente analisada através de técnicas convencionais de análise de hidratos de carbono, incluindo cromatografia de lectina, RMN, Espectrometria de massa, HPLC, GPC, análise da composição de monossacáridos, digestão enzimática sequencial, e HPAEC-PAD, que utiliza cromatografia de permuta aniónica de pH elevado para separar oligossacáridos com base na carga. Os

métodos para libertação de oligossacáridos para fins analíticos são também conhecidos e incluem, sem limitação, tratamento enzimático (vulgarmente efectuado utilizando péptido-N-glicosidase F/endo- α -galactosidase), eliminação utilizando ambiente alcalino rigoroso para libertar estruturas principalmente ligadas em O, e métodos químicos utilizando hidrazina anidra para libertar oligossacáridos ligados em N e em O.

(x) Outras modificações dos anticorpos

Os anticorpos anti-IFN- γ neutralizantes aqui divulgados podem também ser formulados como imunolipossomas. Os lipossomas contendo o anticorpo são preparados através de métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4030 (1980); e Pat. U.S. Nos. 4485045 e 4544545. Os lipossomas com maior tempo de circulação são divulgados na Patente U.S. N.º 5013556.

Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados através do método de evaporação de fase inversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada com PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudidos através de filtros com poro de tamanho definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos Fab' do anticorpo do presente invento podem ser conjugados com os lipossomas tal como descrito em Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) através de uma reacção de intercâmbio de dissulfuretos. Um agente quimioterapêutico (tal como Doxorrubicina) está opcionalmente contido dentro do lipossoma. Ver Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19): 1484 (1989).

O anticorpo do presente invento pode também ser utilizado em ADEPT através de conjugação do anticorpo com uma enzima activadora de um pro-fármaco que converte um pró-fármaco (p.ex., um agente quimioterapêutico peptídico, ver WO81/01145) num fármaco activo. Ver, por exemplo, WO 88/07378 e Patente U.S. N.º 4975278.

A componente enzima do imunoc conjugado útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de actuar num pro-fármaco de modo a convertê-lo na sua forma mais activa exibindo as propriedades biológicas desejadas.

Enzimas que são úteis no método deste invento incluem, mas não se limitam a, fosfatase alcalina útil para conversão de pro-fármacos contendo fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil para conversão de pro-fármacos contendo sulfato em fármacos livres; citosina-desaminase útil para conversão de 5-fluorocitosina não tóxica no fármaco anti-cancro, 5-fluorouracilo; proteases, tais como protease de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis para conversão de pro-fármacos contendo péptidos em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para conversão de pro-fármacos que contêm substituintes de D-aminoácidos; enzima de clivagem de hidratos de carbono tais como -galactosidase e neuraminidase úteis para conversão de pro-fármacos glicosilados em fármacos livres; -lactamase útil para conversão de fármacos derivados com -lactamas em fármacos livres; e penicilina-amidases, tais como penicilina V-amidase ou penicilina G-amidase, úteis para conversão de fármacos derivados nos azotos das suas aminas com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respectivamente, em fármacos livres. Alternativamente, anticorpos com actividade enzimática, também conhecidos na técnica como "abzimas", podem ser utilizados para converter pro-fármacos em fármacos activos livres (ver, p.ex., Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Conjugados anticorpo-abzima podem ser preparados tal como aqui descrito para distribuição da abzima a uma população celular desejada.

As enzimas podem ser covalentemente ligadas aos anticorpos anti-IFN- neutralizantes através de técnicas bem conhecidas na arte tal como a utilização dos reagentes de reticulação heterobifuncionais discutidos acima. Alternativamente, proteínas de fusão compreendendo pelo menos a região de ligação ao antigénio de um anticorpo do invento ligada a pelo menos uma porção funcionalmente activa de uma enzima do invento podem ser construídas utilizando técnicas

de ADN recombinante bem conhecidas na técnica (ver, p.ex., Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604-608 (1984)).

Em certas concretizações do invento, pode ser desejável a utilização de um fragmento de anticorpo, em vez de um anticorpo intacto. Neste caso, pode ser desejável modificar o fragmento de anticorpo para aumentar a sua semivida sérica. Isto pode ser alcançado, por exemplo, através da incorporação de um epítopo de ligação ao receptor de recuperação no fragmento de anticorpo (p.ex., através de mutação da região apropriada no fragmento de anticorpo ou através da incorporação do epítopo num marcador peptídico que é então fundido com o fragmento de anticorpo numa das extremidades ou no meio, p.ex., através de síntese de ADN ou peptídica). Ver WO96/32478 publicada a 17 de Outubro de 1996.

O epítopo de ligação ao receptor de recuperação constitui geralmente uma região em que qualquer um ou mais dos resíduos de aminoácidos de uma ou duas voltas de um domínio Fc são transferidos para uma posição análoga do fragmento de anticorpo. De maior preferência, são transferidos três ou mais resíduos de uma ou duas voltas do domínio Fc. Ainda mais preferido, o epítopo é tomado do domínio CH2 da região Fc (p.ex., de uma IgG) e transferido para a região CH1, CH3, ou V_H, ou mais de uma dessas regiões, do anticorpo. Alternativamente, o epítopo é tomado do domínio CH2 da região Fc e transferido para a região C_L ou a região V_L, ou ambas, do fragmento de anticorpo.

Modificações covalentes dos anticorpos anti-IFN-neutralizantes são também incluídas dentro do âmbito deste invento. Podem ser produzidas através de síntese química ou através de clivagem enzimática ou química do anticorpo, se aplicável. Outros tipos de modificações covalentes do anticorpo são introduzidas na molécula fazendo reagir resíduos de aminoácidos alvo do anticorpo com um agente de derivação orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou os resíduos N ou C-terminais. Modificações covalentes exemplares de polipéptidos são descritas na Patente US 5534615, aqui especificamente incorporada por referência. Um tipo preferido de modificação covalente do anticorpo compreende a ligação do anticorpo a um de uma

variedade de polímeros não proteínáceos, p.ex., polietilenoglicol, polipropilenoglicol, ou polioxialquilenos, do modo exposto nas Patentes U.S. Nos. 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 ou 4179337.

2. Pesquisa de anticorpos com as propriedades desejadas

Técnicas para geração de anticorpos foram descritas acima. Os anticorpos anti-IFN- com as propriedades neutralizantes de amplo espectro desejadas, podem então ser identificados através de métodos conhecidos na técnica.

(i) Ensaios de ligação

Assim, por exemplo, os anticorpos anti-IFN- neutralizantes do presente invento podem ser identificados em ensaios de ligação de IFN- , através de incubação de um anticorpo candidato com um ou mais subtipos individuais de IFN- , ou uma variedade ou mistura de vários subtipos de IFN- , e monitorização da ligação e neutralização de uma actividade biológica de IFN- . O ensaio de ligação pode ser efectuado com um polipéptido ou polipéptidos IFN- purificados. Numa concretização, o ensaio de ligação é um ensaio de ligação competitiva, onde é avaliada a capacidade de um anticorpo candidato para competir com um anticorpo anti-IFN- conhecido pela ligação a IFN- . O ensaio pode ser efectuado em vários formatos, incluindo o formato ELISA, também ilustrado nos Exemplos abaixo. A ligação de IFN- a um anticorpo candidato pode ser monitorizada num ensaio de Biossensor BIAcore™, tal como descrito abaixo.

Qualquer ensaio de ligação de competição adequado conhecido na técnica pode ser utilizado para caracterizar a capacidade de um anticorpo monoclonal anti-IFN- candidato para competir com o anticorpo monoclonal anti-IFN- humano de murídeo 9F3 pela ligação a uma determinada espécie de IFN- . Um ensaio de competição de rotina é descrito em "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988). Noutra concretização, o ensaio ELISA de ligação de IFN- descrito no Exemplo 2 abaixo pode ser modificado para empregar competição pela ligação de IFN- entre um anticorpo candidato e o anticorpo 9F3. Um tal ensaio

pode ser efectuado vertendo o IFN- sobre placas de microtitulação, incubando as placas cobertas com diluições em série de anticorpo anti-IFN- não marcado ou de anticorpo de controlo não marcado misturado com uma concentração seleccionada de anticorpo 9F3 marcado, detectando e medindo o sinal do marcador do anticorpo 9F3, e depois comparando as medições do sinal exibido pelas várias diluições de anticorpo.

(ii) Ensaaios antivirais

A capacidade de um anticorpo candidato para neutralizar uma actividade biológica de IFN- pode, por exemplo, ser realizada através da monitorização da neutralização da actividade antiviral de IFN- tal como descrito por Kawade, *J. Interferon Res.* 1: 61-70 (1980), ou Kawade e Watanabe, *J. Interferon Res.* 4: 571-584 (1984). Resumidamente, uma concentração fixa de IFN- pré-misturado com várias diluições de um anticorpo candidato é adicionada a células FL humanas derivadas do âmnio, e a capacidade do anticorpo candidato para neutralizar a actividade antiviral de IFN- é determinada, utilizando um vírus apropriado, p.ex. vírus Sindbis. Os títulos são expressos em unidades internacionais (IU), tal como determinado com o IFN- humano de referência internacional (NIH Ga23-901-527).

O anticorpo anti-IFN- candidato é considerado capaz de inibir a actividade antiviral de um subtipo de IFN- seleccionado se uma certa concentração do anticorpo inibir mais actividade antiviral que a inibição de nível limiar da actividade antiviral medida na presença de uma concentração equivalente de anticorpo de controlo. Opcionalmente, a certa concentração do anticorpo anti-IFN- candidato inibi~~da~~ pelo menos ou cerca de 60%, ou pelo menos ou cerca de 70%, de preferência pelo menos ou cerca de 75%, ou de maior preferência pelo menos ou cerca de 80%, ou ainda de maior preferência pelo menos ou cerca de 85%, ou ainda de maior preferência pelo menos ou cerca de 90%, ou ainda de maior preferência pelo menos ou cerca de 95%, ou ainda de preferência pelo menos ou cerca de 99% da actividade antiviral do subtipo de IFN- seleccionado no ensaio de actividade antiviral em comparação com a actividade limiar

medida na presença de uma concentração equivalente de anticorpo de controlo. O anticorpo anti-IFN- candidato é considerado incapaz de inibir a actividade antiviral de um subtipo de IFN- seleccionado se não houver concentração do anticorpo que exiba mais inibição da actividade antiviral que a inibição de nível limiar da actividade antiviral medida na presença de uma concentração equivalente de anticorpo de controlo.

Numa concretização preferida, cada espécie de interferão utilizada no ensaio de infecciosidade viral é titulada numa concentração que proporcione o mesmo nível de inibição do crescimento viral que a induzida através de um número pré-seleccionado de unidades de um IFN- padrão. Esta concentração serve para proporcionar as unidades normalizadas da espécie de interferão em questão. Para avaliar a capacidade de um anticorpo anti-IFN- para inibir a actividade antiviral de vários subtipos de IFN- , a concentração eficaz (CE_{50}) do anticorpo anti-IFN- para inibição de 50% da actividade antiviral de um determinado subtipo de IFN- à concentração titulada para proporcionar as unidades normalizadas de actividade) é determinada para cada subtipo de IFN- a testar.

Numa concretização, o ensaio de neutralização da actividade antiviral é efectuado tal como descrito no Exemplo 1 abaixo. Resumidamente, são criadas células A549 até uma densidade de 5×10^5 células A549/poço em placas de microtitulação de 96 poços. Diluições em série do anticorpo anti-IFN- candidato são incubadas com 0,2 unidades/:1 de um subtipo de IFN- seleccionado (normalizado para 0,2 unidades/:1 de IFN- 2 humano recombinante padrão de referência do NIH) num volume total de 100:1 a 37°C durante uma hora. Cada volume de 100:1 de mistura de incubação anticorpo/interferão é então adicionado a 5×10^5 células A549 e 100:1 de meio de cultura num poço individual na placa de microtitulação, rendendo uma concentração final de IFN- de 100 unidades/ml em cada poço. As misturas de cultura celular resultantes são incubadas durante 24 horas a 37°C. As células são então provocadas com 2×10^5 pfu de vírus da encefalomioocardite (EMC) e incubadas durante mais 24 horas a 37°C. No final da incubação, a viabilidade celular é

determinada através de exame microscópico visual ou coloração de violeta cristal. A concentração eficaz (CE_{50}) de um anticorpo de IFN- candidato para inibição de 50% da actividade antiviral de um determinado subtipo de IFN- no ensaio é determinada para cada subtipo de IFN- a testar.

Num aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- que exhibe neutralização de actividade antiviral contra os subtipos em questão de IFN- exhibirá uma CE_0 de até, ou de cerca de, 20 :g/ml, ou até, ou cerca de, 10 :g/ml, ou até, ou cerca de, 5 :g/ml, ou até, ou cerca de, 4 :g/ml, ou até, ou cerca de, 3 :g/ml, ou até, ou cerca de, 2 :g/ml, ou até, ou cerca de, 1 :g/ml em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- que exhibe neutralização de actividade antiviral contra os subtipos em questão de IFN- exhibirá uma CE_0 de, ou cerca de, 0,1 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 0,1 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 0,1 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,1 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de, ou cerca de, 0,1 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, de, ou cerca de, 0,1 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,1 :g/ml a, ou cerca de, 1 :g/ml, em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- com neutralização de actividade antiviral contra os subtipos em questão de IFN- exhibirá uma CE_0 de, ou cerca de, 0,2 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 0,2 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 0,2 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,2 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de ou cerca de, 0,2 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, de ou cerca de, 0,2 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,2 :g/ml a, ou cerca de, 1 :g/ml, em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- γ que neutraliza a actividade antiviral dos subtipos em questão de IFN- γ exibirá uma CE_{50} de, ou cerca de, 0,3 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 0,3 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 0,3 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,3 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de, ou cerca de, 0,3 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, de, ou cerca de, 0,3 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,3 :g/ml a, ou cerca de, 1 :g/ml, em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- γ no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- γ que neutraliza a actividade antiviral dos subtipos em questão de IFN- γ exibirá uma CE_{50} de, ou cerca de, 0,4 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 0,4 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 0,4 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,4 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de, ou cerca de, 0,4 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, de, ou cerca de, 0,4 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,4 :g/ml a, ou cerca de, 1 :g/ml, em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- γ no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- γ que neutraliza a actividade antiviral dos subtipos em questão de IFN- γ exibirá uma CE_{50} de, ou cerca de, 0,5 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 0,5 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 0,5 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,5 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de, ou cerca de, 0,5 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, de, ou cerca de, 0,5 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,5 :g/ml a, ou cerca de, 1 :g/ml, em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- γ no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- γ que neutraliza a actividade antiviral dos subtipos em questão de IFN- γ exibirá uma CE_{50} de, ou cerca de, 0,6 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 0,6 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 0,6 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,6 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de, ou

cerca de, 0,6 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, de, ou cerca de, 0,6 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,6 :g/ml a, ou cerca de, 1 :g/ml, em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- que neutraliza a actividade antiviral dos subtipos em questão de IFN- exibirá uma CE_{50} de, ou cerca de, 0,7 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 0,7 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 0,7 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,7 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de, ou cerca de, 0,7 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, de, ou cerca de, 0,7 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,7 :g/ml a, ou cerca de, 1 :g/ml em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- que neutraliza a actividade antiviral dos subtipos em questão de IFN- exibirá uma CE_{50} de, ou cerca de, 0,8 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 0,8 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 0,8 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,8 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de, ou cerca de, 0,8 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, de, ou cerca de, 0,8 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,8 :g/ml a, ou cerca de, 1 :g/ml, em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- que neutraliza a actividade antiviral dos subtipos em questão de IFN- exibirá uma CE_{50} de, ou cerca de, 0,9 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 0,9 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 0,9 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,9 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de, ou cerca de, 0,9 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, de, ou cerca de, 0,9 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, ou de, ou cerca de, 0,9 :g/ml a, ou cerca de, 1 :g/ml em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

Em outro aspecto do invento, o anticorpo anti-IFN- γ que neutraliza a actividade antiviral dos subtipos em questão de IFN- γ exibirá uma CE_{50} de, ou cerca de, 1 :g/ml a, ou cerca de, 20 :g/ml, de, ou cerca de, 1 :g/ml a, ou cerca de, 10 :g/ml, de, ou cerca de, 1 :g/ml a, ou cerca de, 5 :g/ml, ou de, ou cerca de, 1 :g/ml a, ou cerca de, 4 :g/ml, de, ou cerca de, 1 :g/ml a, ou cerca de, 3 :g/ml, ou de, ou cerca de, 1 :g/ml a, ou cerca de, 2 :g/ml, em relação a cada um dos subtipos em questão de IFN- γ no ensaio de inibição do vírus EMC em células A549 descrito acima.

(iii) Ensaio de bloqueio cruzado

Para pesquisar anticorpos que se ligam a um epítopo num IFN- γ ligado a um anticorpo de interesse, pode ser efectuado um ensaio de bloqueio cruzado de rotina tal como o descrito em "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988). Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser efectuado mapeamento de epítopos através de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o epítopo de IFN- γ ligado a um anticorpo monoclonal do presente invento pode ser determinado através de análise de ligação competitiva tal como descrito em Fendly et al. *Cancer Research* 50: 1550-1558 (1990). Noutro exemplo, podem ser feitos estudos de bloqueio cruzado com fluorescência directa em placas de microtitulação. Neste método, o anticorpo monoclonal de interesse é conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), utilizando procedimentos estabelecidos (Wofsy et al. "Selected Methods in Cellular Immunology", pág. 287, Mishel e Schiigi (eds.) San Francisco; W.J. Freeman Co. (1980)). O IFN- γ seleccionado é vertido sobre os poços de placas de microtitulação, os poços cobertos são incubados com misturas de (1) anticorpo monoclonal de interesse marcado com FITC e (2) anticorpo monoclonal de teste não marcado e a fluorescência em cada poço é quantificada para determinar o nível de bloqueio cruzado exibido pelos anticorpos. Os anticorpos monoclonais são considerados partilharem um epítopo se cada um bloquear a ligação do outro em 50% ou mais em comparação com um anticorpo monoclonal irrelevante de controlo.

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos baseados em células podem então ser seguidos por testes em modelos animais, p.ex. de murídeo, e ensaios clínicos humanos. Se desejado, os anticorpos monoclonais de murídeo identificados como possuindo as propriedades desejadas podem ser convertidos em anticorpos quiméricos, ou humanizados através de técnicas bem conhecidos na arte, incluindo a estratégia de "mutagénese de conversão de genes", tal como descrito na Patente U.S. N.º 5821337, cuja divulgação completa é aqui expressamente incorporada por referência. A humanização de um determinado anticorpo anti-IFN- γ aquié também descrita nos Exemplos abaixo.

(iv) Método de apresentação fágica

Os anticorpos anti-IFN- γ do invento podem ser identificados através da utilização de bibliotecas combinatórias para pesquisar clones sintéticos de anticorpo com a actividade ou actividades desejadas. Em princípio, os clones sintéticos de anticorpo são seleccionados através da pesquisa de bibliotecas fágicas contendo fagos que apresentam vários fragmentos (p.ex. Fab, F(ab')₂, etc.) da região variável do anticorpo (Fv) fundidos com proteína de revestimento fágico. Tais bibliotecas fágicas são crivadas através de cromatografia de afinidade contra o antigénio desejado. Os clones expressando fragmentos Fv capazes de ligação ao antigénio desejado são adsorvidos ao antigénio e assim separados dos clones não ligados na biblioteca. Os clones de ligação são então eluídos do antigénio, e podem ainda ser enriquecidos através de ciclos adicionais de adsorção/eluição do antigénio. Quaisquer dos anticorpos anti-IFN- γ do invento podem ser obtidos através do desenho de um procedimento de pesquisa de antigénio adequado para seleccionar o clone fágico de interesse seguido de construção de um clone do anticorpo anti-IFN- γ inteiro utilizando as sequências Fv do clone fágico de interesse e sequências da região constante (Fc) adequadas descritas em Kabat et al. (1991), *supra*.

Construção de bibliotecas de apresentação fágica

O domínio de ligação ao antigénio de um anticorpo é formado a partir de duas regiões variáveis (V) de cerca de

110 aminoácidos cada uma, das cadeias leve (VL) e pesada (VH), que apresentam ambas três voltas hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDR). Os domínios variáveis podem ser apresentados funcionalmente no fago, como fragmentos Fv de cadeia simples (scFv), nos quais VH e VL são covalentemente ligadas através de um péptido curto, flexível, ou como fragmentos $F(ab')_2$, nos quais cada um é fundido com um domínio constante e interage não covalentemente, tal como descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Tal como aqui se utiliza, os clones fágicos codificando scFv e Fab ou $F(ab')_2$ são referidos colectivamente como "clones fágicos de Fv" ou "clones de Fv".

O repertório ingénuo de um animal (o repertório antes da provocação com o antigénio) proporciona-lhe anticorpos que se podem ligar com afinidade moderada (K_d^{-1} de cerca de 10^6 a 10^7 M^{-1}) a essencialmente qualquer molécula sem ser do próprio. A diversidade de sequência dos locais de ligação do anticorpo não é codificada directamente na linha germinativa mas é montada de um modo combinatório a partir de segmentos do gene de V. Em cadeias pesadas humanas, as primeiras duas voltas hipervariáveis (H1 e H2) são tiradas de menos de 50 segmentos génicos de VH, que são combinados com segmentos D e segmentos JH para criar a terceira volta hipervariável (H3). Em cadeias leves humanas, as primeiras duas voltas hipervariáveis (L1 e L2) e muito da terceira (L3) são tiradas de menos de aproximadamente 30 segmentos V8 e menos de aproximadamente 30 V6 para completar a terceira volta hipervariável (L3).

Cada rearranjo combinatório de segmentos génicos de V em células estaminais dá origem a uma célula B que expressa uma única combinação VH-VL. As imunizações fazem com que quaisquer células B que fazem uma combinação que se liga ao imunogénio proliferem (expansão clonal) e segreguem o anticorpo correspondente. Estes anticorpos ingénuos são então maturados até elevada afinidade (K_d^{-1} de 10^9 - 10^{10} M^{-1}) através de um processo de mutagénese e selecção conhecido como maturação de afinidade. É após este ponto que as células são normalmente removidas para preparar hibridomas e gerar anticorpos monoclonais de elevada afinidade.

A três estádios deste processo, repertórios de genes de VH e VL podem ser clonados separadamente através de reacção em cadeia da polimerase (PCR) e recombinados aleatoriamente em bibliotecas fágicas, que podem então ser pesquisadas quanto a clones de ligação ao antigénio tal como descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). As bibliotecas de fontes imunizadas proporcionam anticorpos de elevada afinidade ao imunogénio sem o requisito de construção de hibridomas. Alternativamente, o repertório ingénuo pode ser clonado para proporcionar uma única fonte de anticorpos humanos para uma ampla variedade de antigénios sem serem do próprio e também do próprio sem qualquer imunização tal como descrito por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, bibliotecas ingénuas podem também ser feitas sinteticamente através da clonagem dos segmentos génicos de V ou VIII não rearranjados a partir de células estaminais, e utilizando iniciadores de PCR contendo sequências aleatórias para codificar as regiões CDR3 altamente variáveis e para alcançar rearranjo *in vitro* tal como descrito por Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

A apresentação fágica imita as células B. Os fagos filamentosos são utilizados para apresentar fragmentos de anticorpo através de fusão com a proteína de revestimento menor pIII. Os fragmentos de anticorpo podem ser apresentados como fragmentos Fv de cadeia simples, nos quais os domínios VH e VL são ligados na mesma cadeia polipeptídica através de um espaçador polipeptídico flexível, p.ex. tal como descrito por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou como fragmentos Fab (incluindo F(ab')₂), nos quais uma cadeia é fundida com pIII e a outra é segregada para o periplasma das células hospedeiras bacterianas onde a montagem de uma estrutura Fab-proteína de revestimento que é apresentada à superfície do fago através do deslocamento de algumas das proteínas de revestimento de tipo selvagem, p.ex. tal como descrito em Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991). Quando os fragmentos de anticorpo são fundidos com o terminal N de pIII, o fago é infeccioso. No entanto, se o domínio N-terminal de pIII for excisado e fusões feitas com o segundo domínio, o fago não é infeccioso, e a pIII de tipo selvagem tem de ser proporcionada por fagos ajudantes.

A fusão de pIII e outras proteínas do fago pode ser codificada inteiramente dentro do mesmo replicão fágico, ou em replicões diferentes. Quando são utilizados dois replicões, a fusão de pIII é codificada num fagemídeo, um plasmídeo contendo uma origem de replicação fágica. Os fagemídeos podem ser empacotados em partículas fágicas através de "recuperação" com um fago ajudante tal como M13K07 que proporcione todas as proteínas fágicas, incluindo pIII, mas devido a uma origem deficiente é ela própria fracamente empacotada em competição com os fagemídeos tal como descrito em Vieira e Messing, *Meth. Enzymol.*, 153: 3-11 (1987). Num método preferido, o sistema de apresentação fágica é desenhado de modo a que o fago recombinante possa crescer em células hospedeiras sob condições que permitam não mais do que uma quantidade menor de partículas fágicas para apresentar mais do que uma cópia da proteína de fusão Fv-proteína de revestimento à superfície da partícula tal como descrito em Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) e em WO 92/09690 (PCT/US91/09133 publicado a 11 de Junho de 1992).

Em geral, ácidos nucleicos codificando fragmentos génicos do anticorpo são obtidos a partir de células imunitárias colhidas a partir de humanos ou animais. Se for desejada uma biblioteca inclinada a favor de clones de anti-IFN- γ , o sujeito é imunizado com IFN- γ para gerar uma resposta de anticorpos, e células do baço e/ou células B em circulação diferentes de linfócitos do sangue periférico (PBL) são recuperadas para construção de bibliotecas. Numa concretização preferida, é obtida uma biblioteca de fragmentos génicos de anticorpo humano inclinada a favor de clones de anti-IFN- γ humano através da geração de uma resposta de anticorpos anti-IFN- γ humano em ratinhos transgénicos possuindo uma série génica de imunoglobulina humana funcional (e sem um sistema funcional de produção de anticorpos endógenos) de modo a que a imunização com IFN- γ dá origem a células B produtoras de anticorpos de sequência humana contra IFN- γ .

Em outra concretização preferida, os animais são imunizados com uma mistura de vários, de preferência todos, os subtipos de IFN- γ para gerar uma resposta de anticorpos que inclua células B produtoras de anticorpos anti-IFN- γ com

ampla reactividade contra subtipos de IFN- γ . Em outra concretização preferida, os animais são imunizados com a mistura de subtipos de IFN- γ humano que está presente nos interferões linfoblastóides humanos segregados por células de linfoma de Burkitt (células Namalva) induzidas com vírus Sendai, tal como descrito no Exemplo 1 abaixo. Uma preparação adequada de tais interferões linfoblastóides humanos pode ser obtida comercialmente (Produto N.º I-9887) em Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

O enriquecimento adicional de populações celulares reactivas com anti-IFN- γ pode ser obtido através da utilização de um procedimento de pesquisa adequado para isolar células B expressando anticorpo específico de IFN- γ ligado à membrana, p.ex., através de separação de células com cromatografia de afinidade de IFN- γ ou adsorção de células a IFN- γ marcado com fluorocromo seguida de separação de células activada com fluorescência (FACS).

Alternativamente, a utilização de células do baço e/ou células B ou outros PBL de um dador não imunizado proporciona uma melhor representação do possível repertório de anticorpos, e permite também a construção de uma biblioteca de anticorpos utilizando qualquer espécie animal (humano ou não humano) na qual IFN- γ não seja antigénico. Para bibliotecas incorporando a construção génica de anticorpos *in vitro*, são colhidas células estaminais do sujeito para proporcionar ácidos nucleicos codificando segmentos génicos de anticorpo não rearranjados. As células imunitárias de interesse podem ser obtidas a partir de uma variedade de espécies animais, tais como espécies humana, de ratinhos, ratos, lagomorfos, lupinas, caninas, felinas, suínas, bovinas, equinas, aviárias e etc.

Ácidos nucleicos codificando segmentos génicos variáveis de anticorpo (incluindo os segmentos VH e VL) são recuperados a partir de células de interesse e amplificados. No caso de bibliotecas de genes de VH e VL rearranjados, o ADN desejado pode ser obtido através de isolamento de ADN genómico ou de ARNm a partir de linfócitos seguido de reacção em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores coincidentes com as extremidades 5' e 3' dos genes de VH e VL rearranjados tal

como descrito em Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3833-3837 (1989), produzindo deste modo diversos repertórios de gene de V para expressão. Os genes de V podem ser amplificados a partir de ADNc e ADN genómico, com iniciadores inversos na extremidade 5' do exão codificando o domínio V maduro e iniciadores directos com base dentro do segmento J tal como descrito em Orlandi *et al.* (1989) e em Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). No entanto, para amplificação do ADNc, iniciadores inversos podem também ser baseados no exão líder tal como descrito em Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), e os iniciadores directos dentro da região constante tal como descrito em Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar a complementaridade, pode ser incorporada degenerescência nos iniciadores tal como descrito em Orlandi *et al.* (1989) ou Sastry *et al.* (1989). De preferência, a diversidade da biblioteca é maximizada através da utilização de iniciadores de PCR dirigidos a cada família de genes de V para amplificar todos os arranjos de VH e VL disponíveis presentes na amostra de ácido nucleico das células imunitárias, p.ex. tal como descrito no método de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) ou tal como descrito no método de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para clonagem do ADN amplificado em vectores de expressão, locais de restrição raros podem ser introduzidos no iniciador de PCR como marcador numa extremidade tal como descrito em Orlandi *et al.* (1989), ou através de mais amplificação por PCR com um iniciador marcado tal como descrito em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Os repertórios de genes de V sinteticamente rearranjados podem ser derivados *in vitro* de segmentos de genes de V. A maioria dos segmentos dos genes de VH humanos foi clonada e sequenciada (relatado em Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), e mapeada (relatado em Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); estes segmentos clonados (incluindo todas as conformações principais da volta H1 e H2) podem ser utilizados para gerar diversos repertórios de genes de VH com iniciadores de PCR codificando voltas H3 de diversas sequências e comprimentos tal como descrito em Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Os repertórios de VH podem também ser feitos com toda a

diversidade de sequências centrada numa longa volta H3 de um único comprimento tal como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Os segmentos V6 e V8 humanos foram clonados e sequenciados (relatado em Williams e Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) e podem ser utilizados para produzir repertórios de cadeias leves sintéticos. Os repertórios de genes de V sintéticos, com base numa variedade de dobras VH e VL, e comprimentos L3 e H3, codificarão anticorpos de considerável diversidade estrutural. Após amplificação dos ADN dos genes de V, os segmentos dos genes de V da linha germinativa podem ser rearranjados *in vitro* de acordo com os métodos de Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Os repertórios de fragmentos de anticorpo podem ser construídos através da combinação de repertórios de genes de VH e VL juntos de vários modos. Cada repertório pode ser criado em diferentes vectores, e os vectores recombinados *in vitro*, p.ex., tal como descrito em Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), ou *in vivo* através de infecção combinatória, p.ex., o sistema loxP descrito em Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). A abordagem de recombinação *in vivo* explora a natureza de duas cadeias dos fragmentos Fab para superar o limite no tamanho da biblioteca imposto pela eficiência da transformação de *E. coli*. Os repertórios ingênuos de VH e VL são clonados separadamente, um num fagemídeo e o outro num vector fágico. As duas bibliotecas são então combinadas através de infecção fágica de bactérias contendo o fagemídeo de modo a que cada célula contenha uma combinação diferente e o tamanho da biblioteca seja limitado apenas pelo número de células presente (cerca de 10^{12} clones). Ambos os vectores contêm sinais de recombinação *in vivo* de modo a que os genes de VH e VL sejam recombinados num único replicão e sejam co-empacotados em viriões fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionam um grande número de diversos anticorpos de boa afinidade (K_d^{-1} de cerca de 10^{-8} M).

Alternativamente, os repertórios podem ser clonados sequencialmente no mesmo vector, p.ex. tal como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), ou montados juntos através de PCR e depois clonados,

p.ex. tal como descrito em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). A montagem por PCR pode também ser utilizada para unir ADN de VH e VL com ADN codificando um espaçador peptídico flexível para formar repertórios de Fv de cadeia simples (scFv). Ainda noutra técnica, é utilizada "montagem por PCR nas células" para combinar os genes de VH e VL dentro de linfócitos através de PCR e depois repertórios de clones de genes ligados tal como descrito em Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Os anticorpos produzidos por bibliotecas ingénuas (naturais ou sintéticas) podem ser de afinidade moderada (K_d^{-1} de cerca de 10^6 a 10^7 M^{-1}), mas a maturação da afinidade pode também ser imitada *in vitro* através da construção e re-selecção de bibliotecas secundárias tal como descrito em Winter *et al.* (1994), *supra*. Por exemplo, a mutação pode ser introduzida aleatoriamente *in vitro* através da utilização de polimerase tendente ao erro (relatada em Leung *et al.*, *Technique*, 1: 11-15 (1989)) no método de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) ou no método de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, a maturação da afinidade pode ser efectuada através de mutação aleatória de uma ou mais CDR, p.ex. utilizando PCR com iniciadores possuindo sequências aleatórias abrangendo CDR de interesse, em clones de Fv individuais seleccionados e pesquisa de clones de maior afinidade. WO 9607754 (publicado a 14 de Março de 1996) descreveu um método para indução de mutagénese numa região determinante de complementaridade da cadeia leve de imunoglobulina para criar uma biblioteca de genes de cadeias leves. Outra abordagem eficaz é recombinar os domínios de VH ou VL seleccionados através de apresentação fágica com repertórios de variantes do domínio V de ocorrência natural obtidos a partir de dadores não imunizados e pesquisa de maior afinidade em vários ciclos de baralhamento das cadeias tal como descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpo com afinidades no intervalo de 10^{-9} M.

Crivagem de bibliotecas de apresentação fágica para clones anti-IFN-

a. Síntese de IFN-

A sequência de ácido nucleico codificando os subtipos de IFN- aqui utilizados pode ser desenhada utilizando sequências de aminoácidos e de ácido nucleico publicadas de interferões, p.ex. ver a compilação de referências *J. Interferon Res.*, 13: 443-444 (1993) contendo sequências de ADN genómico e ADNc para vários interferões de tipo I, e as referências aí citadas. Para sequências de aminoácidos ou sequências de ADNc de IFN- A (IFN- 2), IFN- B (IFN- 8), IFN- C (IFN- 10), IFN- D (IFN- 1), IFN- E (IFN- 22), IFN- F (IFN- 21), IFN- G (IFN- 5), e IFN- H (IFN- 14), ver Figs. 3 e 4 nas páginas 23-24 de Goeddel *et al.*, *Nature*, 290: 20-26 (1981). Para ADNc codificando a sequência de aminoácidos de IFN- 7 (IFN- J), ver Cohert *et al.*, *Dev. Biol. Standard*, 60: 111-122 (1985). Os ADN codificando os interferões de interesse podem ser preparados através de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não se limitam a, síntese química através de qualquer um dos métodos descritos em Engels *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989), tal como os métodos do triéster, do fosfito, do fosforamidito e do H-fosfonato. Numa concretização, os codões preferidos pela célula hospedeira da expressão são utilizados no desenho do ADN codificando o interferão. Alternativamente, o ADN codificando o interferão pode ser isolado a partir de uma biblioteca de ADN genómico ou ADNc.

Após a construção da molécula de ADN codificando o interferão de interesse, a molécula de ADN é ligada operativamente a uma sequência de controlo da expressão num vector de expressão, tal como um plasmídeo, em que a sequência de controlo é reconhecida por uma célula hospedeira transformada com o vector. Em geral, os vectores plasmídicos contêm sequências de replicação e de controlo que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira. O vector possui vulgarmente um local de replicação, bem como sequências que codificam proteínas que são capazes de proporcionar selecção fenotípica em células transformadas.

Para expressão em células procarióticas, vectores adequados incluem pBR322 (ATCC N.º 37017), pHGH107 (ATCC N.º 40011), pBO475, pS0132, pRIT5, qualquer vector na série pRIT20 ou pRIT30 (Nilsson e Abrahmsen, *Meth. Enzymol.*, 185: 144-161 (1990)), pRIT2T, pKK233-2, pDR540 e pPL-lambda. Células hospedeiras procarióticas contendo os vectores de expressão adequados para utilizar aqui incluem *E. coli* K12 estirpe 294 (ATCC N.º 31446), *E. coli* estirpe JM101 (Messing *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 9: 309 (1981)), *E. coli* estirpe B, *E. coli* estirpe 1776 (ATCC N.º 31537), *E. coli* c600 (Appleyard, *Genetics*, 39: 440 (1954)), *E. coli* W3110 (F-, gama-, prototrófica, ATCC N.º 27325), *E. coli* estirpe 27C7 (W3110, *tonA*, *phoA* *E15*, (*argF-lac*)169, *ptr3*, *degP41*, *ompT*, *kan^r*) (Patente U.S. N.º 5288931, ATCC N.º 55244), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcesans*, e espécies de *Pseudomonas*.

Além dos procariotas, organismos eucarióticos, tais como leveduras, ou células derivadas de organismos multicelulares podem ser utilizados como células hospedeiras. Para expressão em células hospedeiras de levedura, tal como fermento de padeiro ou *Saccharomyces cerevisiae*, vectores adequados incluem vectores de replicação epissómica com base no plasmídeo 2-mícron, vectores de integração, e vectores de cromossoma artificial de levedura (YAC). Para expressão em células hospedeiras de insecto, tais como células Sf9, vectores adequados incluem vectores baculovirais. Para expressão em células hospedeiras vegetais, particularmente hospedeiros de plantas dicotiledóneas, tais como tabaco, vectores de expressão adequados incluem vectores derivados do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

No entanto, o interesse tem sido maior em células hospedeiras de vertebrado. Exemplos de células hospedeiras de mamífero úteis incluem a linha de rim de macaco CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linha de rim embrionário humano (293 ou células 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); células de rim de hamster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, *Biol.*

Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linha celular de hepatoma humano (Hep G2). Para expressão em células hospedeiras de mamífero, vectores úteis incluem vectores derivados de SV40, vectores derivados de citomegalovírus tais como vectores pRK, incluindo os vectores pRK5 e pRK7 (Suva et al., *Science*, 237: 893-896 (1987), EP 307247 (3/15/89), EP 278776 (8/17/88)) derivados de vírus vacínia ou outros poxvírus, e vectores retrovirais tais como vectores derivados de vírus de leucemia de murídeo de Moloney (MoMLV).

Opcionalmente, o ADN codificando o interferão de interesse é operativamente ligado a uma sequência líder de secreção resultando em secreção do produto de expressão pela célula hospedeira para o meio de cultura. Exemplos de sequências líderes de secreção incluem stII, ecotin, lamB, herpes GD, lpp, fosfatase alcalina, invertase, e factor alfa. Também adequado para utilizar aqui é a sequência líder de 36 aminoácidos da proteína A (Abrahmsen et al., *EMBO J.*, 4: 3901 (1985)).

As células hospedeiras são transfectadas e de preferência transformadas com os vectores de expressão ou de clonagem acima descritos deste invento e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para induzir promotores, seleccionar transformantes, ou amplificar os genes codificando as sequências desejadas.

A transfecção refere-se à tomada de um vector de expressão por uma célula hospedeira seja ou não expressa de facto alguma sequência de codificação. Numerosos métodos de transfecção são conhecidos das pessoas competentes na matéria, por exemplo, precipitação em CaPO_4 e electroporação. Uma transfecção com sucesso é geralmente reconhecida quando

ocorre qualquer indicação da operação deste vector dentro da célula hospedeira.

A transformação significa a introdução de ADN num organismo de modo a que o ADN seja replicável, como elemento extracromossómico ou através de integrante no cromossoma. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é feita utilizando técnicas padrão apropriadas para tais células. O tratamento de cálcio empregando cloreto de cálcio, tal como descrito na secção 1.82 de Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning" (2ª ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989), é geralmente utilizado para procariotas ou outras células que contenham substanciais barreiras de parede celular. Infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para transformação de certas células vegetais, tal como descrito por Shaw *et al.*, *Gene*, 23: 315 (1983) e WO 89/05859 publicado a 29 de Junho de 1989. Para células de mamífero sem tais paredes celulares, é preferido o método de precipitação de fosfato de cálcio descrito nas secções 16.30-16.37 de Sambrook *et al.*, *supra*. Aspectos gerais das transformações do sistema de células hospedeiras de mamífero foram descritos por Axel em U.S. 4399216 concedida a 16 de Agosto de 1983. As transformações em levedura são tipicamente realizadas de acordo com o método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) e Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). No entanto, podem também ser utilizados outros métodos para introdução de ADN em células tais como injeção nuclear, electroporação ou através de fusão de protoplastos.

As células hospedeiras procarióticas utilizadas para produzir o interferão de interesse podem ser cultivadas tal como descrito geralmente em Sambrook *et al.*, *supra*.

As células hospedeiras de mamífero utilizadas para produzir o interferão de interesse podem ser cultivadas numa variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para cultura das células hospedeiras. Adicionalmente, qualquer um dos meios descritos em Ham e Wallace, *Meth. Enz.*, 58: 44 (1979), Barnes e Sato, *Anal. Biochem.*, 102: 255 (1980), U.S. 4767704;

4657866; 4927762; ou 4560655; WO 90/03430; WO 87/00195; Pat. U.S. Re. 30985; ou U.S. 5122469, cujas divulgações de todos são aqui incorporadas por referência, podem ser utilizados como meios de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormonas e/ou outros factores de crescimento (tais como insulina, transferrina, ou factor de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleósidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como o fármaco Gentamicina[™]), elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos habitualmente presentes a concentrações finais no intervalo micromolar), e glicose ou uma fonte energética equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos nas concentrações apropriadas que seriam conhecidas dos peritos na especialidade. As condições de cultura, tais como temperatura, pH, e semelhantes, são as anteriormente utilizadas com as células hospedeiras seleccionadas para expressão, e serão evidentes para as pessoas competentes na matéria.

As células hospedeiras referidas nesta divulgação englobam células em cultura *in vitro* bem como células que estão num animal hospedeiro.

Num sistema de expressão intracelular ou sistema de secreção para o espaço periplasmático, a proteína interferão expressa de forma recombinante pode ser recuperada a partir das células em cultura através do rompimento da membrana/parede celular da célula hospedeira (p.ex. através de choque osmótico ou solubilização da membrana da célula hospedeira em detergente). Alternativamente, num sistema de secreção extracelular, a proteína recombinante pode ser recuperada a partir do meio de cultura. Como primeiro passo, o meio de cultura ou lisado é centrifugado para remover quaisquer restos celulares particulados. As fracções de membrana e proteínas solúveis são então separadas. Habitualmente, o interferão é purificado a partir da fracção de proteínas solúveis. Se o IFN- for expresso como espécies ligada à membrana, o péptido ligado à membrana pode ser recuperado a partir da fracção de membrana através de solubilização com detergentes. O extracto de péptido bruto

pode ainda ser purificado através de procedimentos adequados tais como fraccionamento em colunas de imunoafinidade ou colunas de permuta iónica; precipitação em etanol; HPLC de fase inversa; cromatografia em sílica ou em resina de permuta cationica tal como DEAE; cromatofocagem; SDS-PAGE; precipitação em sulfato de amónio; utilização de filtração em gel, por exemplo, Sephadex G-75; resinas de afinidade hidrófobas e afinidade do ligando utilizando receptor do interferão imobilizado numa matriz.

Muitos dos IFN- humanos aqui utilizados podem ser obtidos a partir de fontes comerciais, p.ex. em Sigma (St. Louis, MO), Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA) ou ACCURATE Chemical & Scientific Corporation (Westbury, NY).

Os procedimentos de clonagem padrão descritos em Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) são utilizados para construir plasmídeos que dirigem a translocação das várias espécies de hIFN- para o espaço periplasmático de *E. coli*. As reacções de PCR são efectuadas em clones de ADNc das várias subespécies de hIFN- divulgadas em Goeddel et al., *Nature* 290: 20-26 (1981) com os locais de restrição *NsiI* e *StyI* adicionados aos iniciadores. Estes produtos de PCR são então subclonados nos locais correspondentes do vector de expressão pB0720 descrito em Cunningham et al., *Science* 243: 1330-1336 (1989). Os plasmídeos resultantes colocam a produção dos subtipos de hIFN- sob controlo do promotor *phoA* de *E. coli* e o péptido sinal da enterotoxina II termoestável tal como descrito em Chang et al., *Gene* 55: 189-196 (1987). A sequência de ADN correcta de cada gene é confirmada utilizando o United States Biochemical Sequenase Kit versão 2.0. Cada plasmídeo é transformado para a estirpe 27C7 de *E. coli* (ATCC # 55244) e criado em fermentadores de 10 litros tal como descrito em Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992). Os hIFN humanos são purificados a partir da pasta de *E. coli* contendo cada IFN- através de cromatografia de afinidade. As células bacterianas são lisadas, e o lisado é centrifugado a 10000 xg para remover os restos. O sobrenadante é aplicado numa coluna de imunoafinidade contendo um anticorpo anti-hIFN- B de

ratinho (LI-1) que é obtido tal como descrito em Staehelin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1848-1852 (1981). LI-1 é imobilizado em vidro de poro controlado através de uma modificação do método de Roy *et al.*, *Journal of Chromatography*, 303: 225-228 (1984). O interferão ligado é eluído da coluna com citrato 0,1 M, pH 3,0, contendo glicerol a 20% (p/v). O IFN purificado é analisado através de SDS-PAGE e imunomarcação, e é ensaiado quanto à bioactividade através de ensaio antiviral induzido por hIFN tal como aqui descrito.

A molécula híbrida IFN- 2/1 humano (IFN- _{1-62/64-166}) foi obtida tal como descrito em Rehberg *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 11497-11502 (1992) ou Horisberger e Marco, *Pharmac. Ther.*, 66: 507-534 (1995).

b. Imobilização de IFN-

O IFN- purificado pode ser ligado a uma matriz adequada tal como contas de agarose, contas de acrilamida, contas de vidro, celulose, vários copolímeros acrílicos, géis de hidroxilmetacrilato, copolímeros poliacrílicos e polimetacrílicos, nylon, transportadores neutros e iónicos, e semelhantes, para utilizar na separação cromatográfica de afinidade dos clones de apresentação fágica. A união da proteína IFN- à matriz pode ser alcançada através dos métodos descritos em *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Uma técnica vulgarmente empregue para unir ligandos proteicos a matrizes polissacarídicas, p.ex. agarose, dextrano ou celulose, envolve a activação do transportador com halogenetos de cianogénio e subsequente ligação das aminas alifáticas ou aromáticas primárias do ligando peptídico à matriz activada.

Alternativamente, IFN- pode ser utilizado para revestir os poços de placas de adsorção, expresso em células hospedeiras fixas a placas de adsorção ou utilizado em separação de células, ou conjugado com biotina para captura com contas revestidas com estreptavidina, ou utilizado em qualquer método conhecido na técnica para crivagem de bibliotecas de apresentação fágica.

c. Procedimentos de Crivagem

As amostras de bibliotecas fágicas são colocadas em contacto com o IFN- immobilizado sob condições adequadas para ligação de pelo menos uma porção das partículas fágicas com o adsorvente. Normalmente, as condições, incluindo pH, força iónica, temperatura e semelhantes são seleccionadas para imitar condições fisiológicas. Os fagos ligados à fase sólida são lavados e depois eluídos através de ácido, p.ex. tal como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), ou de álcali, p.ex. tal como descrito em Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou através de antigénio IFN- , p.ex. num procedimento semelhante ao método de competição de antigénio de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Os fagos podem ser enriquecidos 20-1000 vezes num único ciclo de selecção. Além disso, os fagos enriquecidos podem ser criados em cultura bacteriana e sujeitos a outros ciclos de selecção.

Numa concretização preferida, os fagos são incubados em série com vários subtipos de IFN- immobilizados para identificar e melhor caracterizar clones fágicos que exibam uma ligação apreciável a uma maioria, de preferência todos, os subtipos de IFN- . Neste método, os fagos são primeiro incubados com um subtipo específico de IFN- . Os fagos ligados a este subtipo são eluídos e sujeitos a selecção com outro subtipo de IFN- . O processo de ligação e eluição é assim repetido com todos os subtipos de IFN- . No final, o procedimento rende uma população de anticorpos de apresentação fágica com ampla reactividade contra todos os subtipos de IFN- . Estes fagos podem então ser testados contra outras espécies de IFN, i.e. outra além de IFN- , para seleccionar os clones que não mostram uma ligação apreciável a outras espécies de IFN. Finalmente, os clones de fagos seleccionados podem ser examinados quanto à sua capacidade para neutralizar a actividade biológica, p.ex. actividade antiviral, dos vários subtipos de IFN- , e clones representando anticorpos com ampla actividade de neutralização contra uma maioria, de preferência todos, os subtipos de IFN- são finalmente seleccionados.

A eficiência da selecção depende de muitos factores, incluindo a cinética de dissociação durante a lavagem, e de se múltiplos fragmentos de anticorpo num único fago se podem simultaneamente envolver com o antigénio. Os anticorpos com uma cinética de dissociação rápida (e fracas afinidades de ligação) podem ser retidos através da utilização de curtas lavagens, apresentação fágica multivalente e elevada densidade de revestimento de antigénio em fase sólida. A elevada densidade não só estabiliza o fago através de interações multivalentes, como favorece a re-ligação do fago que se dissociou. A selecção de anticorpos com uma cinética de dissociação lenta (e boas afinidades de ligação) pode ser promovida através da utilização de lavagens longas e apresentação fágica monovalente tal como descrito em Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) e em WO 92/09690, e uma baixa densidade de revestimento do antigénio tal como descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

É possível seleccionar entre anticorpos fágicos de diferentes afinidades, mesmo com afinidades que difiram ligeiramente, para IFN- γ . No entanto, a mutação aleatória de um anticorpo seleccionado (p.ex. tal como efectuada nalgumas técnicas de maturação de afinidade descritas acima) é provável que dê origem a muitos mutantes, a maioria com ligação ao antigénio, e alguns com afinidade mais elevada. Com IFN- γ limitante, os raros fagos de elevada afinidade podem ser eliminados por competição. Para manter todos os mutantes de afinidade mais elevada, os fagos podem ser incubados com excesso de IFN- γ biotinilado, mas com o IFN- γ biotinilado a uma concentração de molaridade mais baixa que a afinidade molar alvo constante para IFN- γ . Os fagos de ligação de elevada afinidade podem então ser capturados através de contas paramagnéticas revestidas com estreptavidina. Tal "captura de equilíbrio" permite que os anticorpos sejam seleccionados de acordo com as suas afinidades de ligação, com sensibilidade que permita o isolamento de clones mutantes com uma afinidade apenas duas vezes mais elevada a partir de um grande excesso de fagos com menor afinidade. As condições utilizadas na lavagem de fagos ligados a uma fase sólida podem também ser manipuladas para discriminar com base na cinética de dissociação.

Numa concretização, os fagos são incubados em série com vários subtipos de IFN- γ imobilizados num suporte sólido, tais como as contas de matriz polimérica cromatográfica descritas acima. Neste método, os fagos são primeiro incubados com um subtipo específico de IFN- γ . Os fagos ligados a este subtipo são eluídos da fase sólida com um eluente adequado, tal como qualquer tampão salino ou ácido capaz de libertar os fagos ligados para solução. A seguir, os clones dos fagos eluídos são sujeitos a selecção com outro subtipo de IFN- γ . Para enriquecer a população em clones que compitam com IFNAR2 solúvel pela ligação a IFN- γ , os clones fágicos recuperados a partir da série de separações cromatográficas de subtipos de IFN- γ são incubados com um complexo de IFNAR2 imobilizado pré-adsorvido a IFN- γ , e os clones fágicos não adsorvidos são recuperados a partir da mistura reaccional da incubação.

Os procedimentos de selecção podem ser desenhados para utilizar qualquer técnica cromatográfica em lotes. Numa concretização, os clones fágicos são adsorvidos em contas de matriz polimérica derivadas de IFN- γ em suspensão, as contas adsorvidas são recuperadas através de centrifugação, as contas recuperadas são ressuspensas e incubadas num tampão de eluição adequado, tal como qualquer sal ou tampão ácido capaz de libertar o fago ligado para solução, a mistura de eluição é centrifugada, os clones fágicos eluídos são recuperados a partir do sobrenadante, e depois o procedimento de adsorção/eluição é repetido para cada subtipo de IFN- γ adicional. Para enriquecer a população em clones que compitam com IFNAR2 solúvel pela ligação a IFN- γ , os clones fágicos recuperados a partir das separações cromatográficas dos subtipos de IFN- γ são incubados com uma suspensão de contas de matriz polimérica derivadas de IFNAR2 pré-adsorvidas com IFN- γ , a mistura de incubação é centrifugada, e os clones fágicos não adsorvidos são recuperados a partir do sobrenadante.

Em outra concretização, o procedimento de selecção é desenhado para enriquecer a população de fagos na propriedade de inibição da ligação de IFN- γ a IFNAR2 durante cada uma das separações cromatográficas de afinidade. Neste método, os fagos são incubados em série com cada um dos subtipos

específicos de IFN- γ immobilizados num suporte sólido e depois eluídos a partir da fase sólida com um eluente compreendendo um excesso de IFNAR2 solúvel, tal como ECD-Fc de IgG de IFNAR2, sob condições em que o IFNAR2 solúvel é capaz de deslocar qualquer clone fágico que compita com IFNAR2 pela ligação ao IFN- γ immobilizado. O processo de ligação e eluição é assim repetido com cada um dos subtipos específicos de IFN- γ .

Em outra concretização, os clones fágicos são adsorvidos a contas de matriz polimérica derivadas de IFN- γ em suspensão, as contas adsorvidas são recuperadas através de centrifugação, as contas recuperadas são ressuspensas e incubadas num tampão de eluição adequado compreendendo um excesso de IFNAR2 solúvel (tal como ECD-Fc de IgG de IFNAR2) sob condições em que o IFNAR2 solúvel seja capaz de deslocar qualquer clone fágico que compita com IFNAR2 pela ligação ao IFN- γ immobilizado e libertar o fago ligado para a solução, a mistura de eluição é centrifugada, os clones fágicos eluídos são recuperados a partir do sobrenadante, e depois o procedimento de adsorção/eluição é repetido para cada subtipo de IFN- γ adicional.

No final, o procedimento rende uma população de anticorpos de apresentação fágica com actividade de inibição da ligação a IFNAR2 contra uma ampla variedade de subtipos de IFN- γ . Estes fagos podem então ser testados contra outras espécies de IFN (outras para além das espécies de IFN- γ), tais como IFN- α , para seleccionar os clones que não apresentam uma ligação apreciável a outras espécies de IFN. Finalmente, os clones fágicos seleccionados podem ser examinados quanto à sua capacidade para neutralizar a actividade biológica, p.ex. a actividade antiviral, de vários subtipos de IFN- γ , e são finalmente seleccionados clones representando anticorpos com ampla actividade de neutralização contra uma maioria, de preferência todos, os subtipos de IFN- γ .

Seleção da Actividade de Clones Anti-IFN- γ

Numa concretização, o invento proporciona anticorpos anti-IFN- γ que se ligam bem como neutralizam a actividade de

uma maioria, de preferência todos, os subtipos de IFN- γ , mas não se ligam ou neutralizam significativamente a actividade de qualquer outra espécie de interferão. Por exemplo, a capacidade de vários clones fágicos para neutralizar as actividades antivirais de vários subtipos de IFN- γ pode ser testada, essencialmente do mesmo modo como descrito anteriormente para os anticorpos.

4. Preparação de IFNAR2-IgG solúvel

Um ADNc codificando as proteínas de fusão de imunoglobulina humana (imunoadesinas) com base no domínio extracelular (ECD) do hIFNAR2 (clone pRK5 hIFNAR2-IgG) pode ser gerado utilizando métodos semelhantes aos descritos por Haak-Frendscho *et al.*, *Immunology* 79; 594-599 (1993) para a construção de uma imunoadesina do receptor de IFN- γ de murídeo. Resumidamente, o plasmídeo pRKCD4₂Fc₁ é construído tal como descrito no Exemplo 4 de WO 89/02922 (PCT/US88/03414 publicado a 6 de Abril de 1989). A sequência de codificação do ADNc para os primeiros 216 resíduos do ECD maduro de hIFNAR2 é obtida a partir da sequência publicada (Novick *et al.*, *Cell*, 77: 391-400 (1994)). A sequência de codificação de CD4 no pRKCD4₂Fc₁ é substituída com o ADNc codificando o ECD de hIFNAR2 para formar o clone pRK5hIFNAR2-IgG. hIFNAR2-IgG é expresso em células de rim embrionário humano 293 através de transfecção transiente utilizando uma técnica de precipitação de fosfato de cálcio. A imunoadesina é purificada a partir dos sobrenadantes da cultura celular sem soro num único passo através de cromatografia de afinidade numa coluna de proteína A-sepharose tal como descrito em Haak-Frendscho *et al.* (1993), *supra*. A hIFNAR2-IgG ligada é eluída com tampão citrato 0,1 M, pH 3,0, contendo glicerol a 20% (p/v). A hIFNAR2-IgG purificada é mais de 95% pura, avaliada através de SDS-PAGE.

5. Utilizações de diagnóstico de anticorpos anti-IFN- γ

Os anticorpos anti-IFN- γ do invento são reagentes de investigação únicos em ensaios de diagnóstico para expressão de IFN- γ . Tal como discutido anteriormente, a expressão de IFN- γ é aumentada em certas doenças auto-imunes tais como DMDI, LSE, e tiroidite auto-imune. A maior expressão de vários subtipos de IFN- γ em tais distúrbios pode ser

detectada e quantificada utilizando os anticorpos anti-IFN- γ do presente invento com ampla reactividade contra a maioria dos subtipos de IFN- γ . Os anticorpos anti-IFN- γ são também úteis para a purificação de afinidade de vários subtipos de IFN- γ a partir de cultura de células recombinantes ou de fontes naturais.

Os anticorpos anti-IFN- γ podem ser utilizados para a detecção de IFN- γ em qualquer um de vários métodos de ensaio de diagnóstico bem conhecidos. Por exemplo, uma amostra biológica pode ser ensaiada quanto a IFN- γ através da obtenção da amostra a partir de uma fonte desejada, mistura da amostra com anticorpo anti-IFN- γ para permitir que o anticorpo forme o complexo anticorpo/IFN- γ com qualquer subtipo de IFN- γ presente na mistura, e detecção de qualquer complexo anticorpo/IFN- γ presente na mistura. A amostra biológica pode ser preparada para ensaio através de métodos conhecidos na técnica que sejam adequados para a amostra particular. Os métodos de mistura da amostra com anticorpos e os métodos de detecção do complexo anticorpo/IFN- γ são escolhidos de acordo com o tipo de ensaio utilizado. Tais ensaios incluem ensaios competitivos e em sanduíche, e ensaios de inibição estereoquímica. Os métodos competitivos e em sanduíche empregam um passo de separação de fases como parte integral do método enquanto os ensaios de inibição estereoquímica são conduzidos numa única mistura reaccional.

Os métodos analíticos para IFN- γ utilizam todos um ou mais dos seguintes reagentes: análogo de IFN- γ marcado, análogo de IFN- γ imobilizado, anticorpo anti-IFN- γ marcado, anticorpo anti-IFN- γ imobilizado e conjugados estereoquímicos. Os reagentes marcados são também conhecidos como "rastreadores".

O marcador utilizado é qualquer funcionalidade detectável que não interfira com a ligação de IFN- γ e o anticorpo anti-IFN- γ . São conhecidos numerosos marcadores para utilizar em imunoensaio, exemplos incluindo porções que podem ser detectadas directamente, tais como marcadores fluoróchromos, quimioluminescentes, e radioactivos, bem como porções, tais como enzimas, que devem reagir ou ser derivados para serem detectados. Exemplos de tais marcadores incluem os

radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , e ^{131}I , fluoróforos tais como quelatos de terras raras ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferases, p.ex., luciferase do pirilampo e luciferase bacteriana (Pat. U.S. N.º 4737456), luciferina, 2,3-di-hidroftalazinadionas, peroxidase de rábano (HRP), fosfatase alcalina, -galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacárido-oxidases, p.ex., glicose-oxidase, galactose-oxidase, e glicose-6-fosfato-desidrogenase, oxidases heterocíclicas tais como uricase e xantina-oxidase, ligadas a uma enzima que emprega peróxido de hidrogénio para oxidar um corante precursor tal como HRP, lactoperoxidase, ou microperoxidase, biotina/avidina, marcadores de *spin*, marcadores de bacteriófagos, radicais livres estáveis, e semelhantes.

Estão disponíveis métodos convencionais para ligar covalentemente estes marcadores a proteínas ou polipéptidos. Por exemplo, agentes de conjugação tais como dialdeídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, benzidina bis-diazotizada e semelhantes podem ser utilizados para marcar os anticorpos com os marcadores fluorescentes, quimioluminescentes e enzimáticos acima descritos. Ver, por exemplo, Pat U.S. Nos. 3940475 (fluorimetria) e 3645090 (enzimas); Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); e Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Os marcadores preferidos aqui são enzimas tais como peroxidase de rábano e fosfatase alcalina.

A conjugação de tal marcador, incluindo as enzimas, com o anticorpo é um procedimento manipulativo padrão para uma pessoa competente em técnicas de imunoensaio. Ver, por exemplo, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", em *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone e H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), págs. 147-166.

A imobilização de reagentes é necessária para certos métodos de ensaio. A imobilização implica a separação do anticorpo anti-IFN- a partir de qualquer IFN- que permaneça livre em solução. Isto é convencionalmente alcançado através

da insolubilização do anticorpo anti-IFN- ou análogo de IFN- antes do procedimento de ensaio, tal como através de adsorção a uma matriz insolúvel em água ou superfície (Bennich *et al.*, U.S. 3720760), através de ligação covalente (por exemplo, utilizando reticulação de glutaraldeído), ou através de insolubilização do anticorpo anti-IFN- ou análogo de IFN- depois, p.ex., através de imunoprecipitação.

Outros métodos de ensaio, conhecidos como ensaios competitivos ou em sanduíche, estão bem estabelecidos e são amplamente utilizados na indústria de reagentes comerciais de diagnóstico.

Os ensaios competitivos baseiam-se na capacidade de um análogo de IFN- rastreador para competir com o IFN- da amostra de teste por um número limitado de locais de ligação ao antigénio do anticorpo anti-IFN-. O anticorpo anti-IFN- é geralmente insolubilizado antes ou depois da competição e depois o rastreador e o IFN- ligado ao anticorpo anti-IFN- são separados do rastreador não ligado e IFN-. Esta separação é alcançada através de decantação (quando o parceiro de ligação foi pré-insolubilizado) ou através de centrifugação (quando o parceiro de ligação foi precipitado após a reacção competitiva). A quantidade de IFN- na amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de rastreador ligado medida através da quantidade da substância marcadora. As curvas de resposta à dose com quantidades conhecidas de IFN- são preparadas e comparadas com os resultados dos testes para determinar quantitativamente a quantidade de IFN- presente na amostra de teste. Estes ensaios são designados sistemas ELISA quando são utilizadas enzimas como marcadores detectáveis.

Outra espécie de ensaio competitivo, designado um ensaio "homogéneo", não requer uma separação de fases. Aqui, um conjugado de uma enzima com o IFN- é preparado e utilizado de modo a que quando o anticorpo anti-IFN- se liga ao IFN- a presença do anticorpo anti-IFN- modifica a actividade enzimática. Neste caso, o IFN- ou seus fragmentos imunologicamente activos são conjugados com uma ponte orgânica bifuncional a uma enzima tal como peroxidase. Os conjugados são seleccionados para utilizar com anticorpo anti-IFN- de modo a que a ligação do anticorpo anti-IFN-

iniba ou potencie a actividade enzimática do marcador. Este método *per se* é amplamente praticado com o nome de EMIT.

Os conjugados estereoquímicos são utilizados em métodos de impedimento estereoquímico para ensaio homogéneo. Estes conjugados são sintetizados através da ligação covalente de um hapteno de baixo peso molecular a um pequeno fragmento de IFN- de modo a que o anticorpo para o hapteno seja substancialmente incapaz de se ligar ao conjugado ao mesmo tempo que o anticorpo anti-IFN- . Neste procedimento de ensaio o IFN- presente na amostra de teste ligar-se-á ao anticorpo anti-IFN- , permitindo deste modo que o anti-hapteno se ligue ao conjugado, resultando numa mudança no carácter do hapteno conjugado, p.ex., uma mudança na fluorescência quando o hapteno é um fluoróforo.

Os ensaios em sanduíche são particularmente úteis para a determinação de IFN- ou anticorpos anti-IFN- . Em ensaios em sanduíche sequenciais um anticorpo anti-IFN- imobilizado é utilizado para adsorver o IFN- da amostra de teste, a amostra de teste é removida através de lavagem, o IFN- ligado é utilizado para adsorver um segundo anticorpo anti-IFN- marcado e o material ligado é então separado a partir do rastreador residual. A quantidade de rastreador ligado é directamente proporcional ao IFN- da amostra de teste. Em ensaios em sanduíche "simultâneos" a amostra de teste não é separada antes da adição do anti-IFN- marcado. Um ensaio em sanduíche sequencial utilizando um anticorpo monoclonal anti-IFN- como um anticorpo e um anticorpo policlonal anti-IFN- como o outro é útil no teste de amostras quanto a IFN- .

O anterior são ensaios de diagnóstico meramente exemplificativos para IFN- . Outros métodos desenvolvidos agora ou a partir de agora que utilizem o anticorpo anti-IFN- para a determinação de IFN- são incluídos dentro do âmbito daqui, incluindo os bioensaios descritos acima.

6. Composições terapêuticas e administração de anticorpos anti-IFN-

Formulações terapêuticas dos anticorpos anti-IFN- do invento são preparadas para armazenamento através da mistura do anticorpo possuindo o grau desejado de pureza com

transportadores, excipientes, ou estabilizadores opcionais fisiologicamente aceitáveis (Remington: "The Science and Practice of Pharmacy", 19ª Edição, Alfonso, R., ed, Mack Publishing Co. (Easton, PA: 1995)), na forma de bolo liofilizado ou soluções aquosas. Os transportadores, excipientes ou estabilizadores aceitáveis são não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; álcoois de açúcar tais como manitol ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como Tween, Pluronic ou polietilenoglicol (PEG).

O anticorpo anti-IFN- γ a utilizar para administração *in vivo* tem de ser estéril. Isto é facilmente alcançado através de filtração através de membranas de esterilização por filtração, antes ou após liofilização e reconstituição. O anticorpo anti-IFN- γ será vulgarmente armazenado na forma liofilizada ou em solução.

As composições terapêuticas de anticorpo anti-IFN- γ são geralmente colocadas num recipiente possuindo uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco de solução intravenosa ou um frasco com tampa perfurável através de uma agulha de injeção hipodérmica.

A via de administração do anticorpo anti-IFN- γ está de acordo com métodos conhecidos, p.ex. injeção ou infusão através das vias intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, subcutânea, intramuscular, intra-ocular, intra-arterial, intracerebrospinal, ou intralesional, ou através de sistemas de libertação sustida tal como observado abaixo. De preferência o anticorpo é dado sistemicamente.

Exemplos de preparações de libertação sustida adequadas incluem matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos moldados, p.ex. películas, ou microcápsulas. Matrizes de libertação sustida incluem poliésteres, hidrogéis, poliláctidos (U.S. 3773919, EP 58481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato (Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) e Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), acetato de etileno-vinilo (Langer et al., *supra*) ou ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133988). Composições de anticorpo anti-IFNAR2 de libertação sustida incluem também anticorpo aprisionado em lipossomas. Lipossomas contendo anticorpo são preparados através de métodos conhecidos *per se*: DE 3218121; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949; EP 142641; Pedido de Patente Japonesa 83-118008; U.S. 4485045 e 4544545; e EP 102324. Vulgarmente os lipossomas são do tipo unilamelar pequeno (cerca de 200-800 Angstroms) no qual o teor lipídico é superior a cerca de 30 mol. % de colesterol, sendo a proporção seleccionada ajustada para a terapia de anticorpo óptima.

O anticorpo anti-IFN- pode também ser administrado através de inalação. Nebulizadores comercialmente disponíveis para formulações líquidas, incluindo nebulizadores a jacto e nebulizadores de ultra-sons são úteis para administração. As formulações líquidas podem ser directamente nebulizadas e o pó liofilizado pode ser nebulizado após reconstituição. Alternativamente, o anticorpo anti-IFN- pode ser tornado em aerossol utilizando uma formulação de fluorocarbono e um inalador de doses medidas, ou inalado como pó liofilizado e moído.

Uma "quantidade eficaz" de anticorpo anti-IFN- a empregar terapeuticamente dependerá, por exemplo, dos objectivos terapêuticos, da via de administração, do tipo de anticorpo anti-IFN- empregue, e da condição do paciente. Concordantemente, será necessário que o terapeuta titule a dosagem e modifique a via de administração conforme necessário para obter o efeito terapêutico óptimo.

Tipicamente, o clínico administrará o anticorpo anti-IFN- até que seja atingida uma dosagem que alcance o efeito desejado. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado através de ensaios convencionais.

Os pacientes a tratar com o anticorpo anti-IFN- do invento incluem pacientes pré-clínicos ou aqueles com surgimento recente de distúrbios mediados pelo sistema imunitário, e particularmente distúrbios auto-imunes. Os pacientes são candidatos a terapia de acordo com este invento até ao ponto em que não restem tecidos saudáveis a proteger da destruição mediada pelo sistema imunitário. Por exemplo, um paciente sofrendo de diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI) pode beneficiar de terapia com um anticorpo anti-IFN- do invento até as células dos ilhéus pancreáticos do paciente deixarem de ser viáveis. É desejável administrar um anticorpo anti-IFN- tão cedo quanto possível no desenvolvimento do distúrbio mediado pelo sistema imunitário ou auto-imune, e continuar o tratamento durante tanto tempo quanto o necessário para a protecção de tecido saudável da destruição pelo sistema imunitário do paciente. Por exemplo, o paciente de DMDI é tratado enquanto a monitorização da insulina demonstrar uma resposta dos ilhéus adequada e outros indícios de necrose dos ilhéus diminuírem (p.ex. redução dos títulos de anticorpos anti-ilhéus), após o que o paciente pode ser retirado do tratamento de anticorpo anti-IFN- durante um período de ensaio durante o qual a resposta à insulina e do nível de anticorpos anti-ilhéus são monitorizados quanto a um relapso.

No tratamento e prevenção de um distúrbio mediado pelo sistema imunitário ou auto-imune através de um anticorpo anti-IFN- , a composição de anticorpo será formulada, doseada, e administrada de um modo consistente com a boa prática médica. Factores para consideração neste contexto incluem o distúrbio particular a tratar, o mamífero particular a tratar, a condição clínica de cada paciente, a causa do distúrbio, o local de distribuição do anticorpo, o tipo particular de anticorpo, o método de administração, o calendário de administração, e outros factores conhecidos dos médicos assistentes. A "quantidade terapeuticamente eficaz" de anticorpo a administrar será governada através de tais

considerações, e é a quantidade mínima necessária para prevenir, melhorar, ou tratar o distúrbio, incluindo tratamento de condições auto-imunes crónicas e manutenção da imunossupressão em receptores de transplantes. Tal quantidade está de preferência abaixo da quantidade que é tóxica para o hospedeiro ou torna o hospedeiro significativamente mais susceptível a infecções.

Como composição geral, a quantidade farmacologicamente eficaz inicial do anticorpo administrada parentericamente estará no intervalo de cerca de 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal do paciente por dia, sendo o intervalo inicial típico de anticorpo utilizado de 0,3 a 20 mg/kg/dia, de preferência de 0,3 a 15 mg/kg/dia. A dosagem desejada pode ser distribuída através da administração de um bolo único, através de múltiplas administrações de bolos, ou através de administração por infusão contínua de anticorpo, dependendo do padrão de declínio farmacocinético que o médico deseje alcançar.

Tal como observado acima, no entanto, estas quantidades sugeridas de anticorpo são sujeitas a uma grande descrição terapêutica. O factor chave na selecção de uma dose e calendário apropriados é o resultado obtido, tal como indicado acima.

O anticorpo não necessita de ser, mas é opcionalmente, formulado com um ou mais agentes actualmente utilizados para prevenir ou tratar o distúrbio mediado pelo sistema imunitário ou auto-imune em questão. Por exemplo, em artrite reumatóide, o anticorpo pode ser dado em conjunto com um glucocorticosteróide. A quantidade eficaz de tais agentes depende da quantidade de anticorpo anti-IFN- presente na formulação, do tipo de distúrbio ou tratamento, e de outros factores discutidos acima. Estes são geralmente utilizados nas mesmas dosagens e com vias de administração tal como aqui utilizadas anteriormente ou cerca de 1 a 99% das dosagens empregues até agora.

Mais detalhes do invento podem ser verificados nos exemplos seguintes, que definem melhor o âmbito do invento.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são dados para fins de ilustração e não para fins de limitação. Os exemplos são proporcionados de modo a proporcionar aos de vulgar perícia na técnica uma completa divulgação e descrição de como produzir e utilizar os compostos, as composições, e os métodos do invento e não se pretende que limitem o âmbito do que os inventores consideram o seu invento. Foram feitos esforços para assegurar precisão em relação aos números utilizados (p.ex., quantidades, temperatura, etc.), mas alguns erros experimentais e desvios devem ser tidos em conta. A menos que indicado em contrário, as partes são partes em peso, a temperatura é em graus C, e a pressão é a atmosférica ou próximo desta.

Exemplo 1. Geração e caracterização de um anticorpo monoclonal de ratinho anti-IFN- amplamente reactivo

Materiais e Métodos

Um anticorpo monoclonal de murídeo com ampla reactividade contra subtipos de IFN-

Um anticorpo neutralizante para pan-IFN- foi desenvolvido através de ratinhos imunizados sequencialmente com a mistura de subtipos de IFN- humano, gerando um grande número de mAb candidatos, e depois pesquisa quanto a ligação e actividade. Em particular, ratinhos Balb/c foram imunizados em cada almofada da pata traseira 9 vezes (a intervalos de duas semanas) com 2,5 :g de hIFN- γ linfoblastóide (Produto N.º I-9887 de Sigma, St. Louis, MO) ressuspenso em MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Inc., Hamilton, MT). Três dias após o reforço final, células do nódulo linfático poplíteo foram fundidas com células de mieloma de murídeo P3X63Ag8.U.1 (ATCC CRL1597), utilizando polietilenoglicol a 35%. Os hibridomas foram seleccionados em meio HAT. Dez dias após a fusão, os sobrenadantes da cultura de hibridoma foram primeiro pesquisados quanto à ligação de mAb às várias espécies de hIFN- num ELISA. Os sobrenadantes da cultura de hibridoma seleccionados foram então testados quanto à sua capacidade para inibir o efeito citopático antiviral de IFN em células da linha celular de carcinoma do pulmão humano

A549 tal como descrito abaixo. Tal como indicado na Fig. 1, três mAb obtidos a partir de 1794 poços de fusão foram capazes de neutralizar um conjunto diverso de subtipos de IFN- γ . Estes três mAb foram subclonados e re-analisados.

Neutralização da actividade antiviral de IFN- γ

A capacidade de um anticorpo candidato para neutralizar a actividade antiviral de IFN- γ foi ensaiada tal como descrito por Yousefi, S., et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 83: 735-740 (1985). Resumidamente, o ensaio foi efectuado utilizando células de carcinoma pulmonar humano A549 provocadas com o vírus da encefalomiocardite (EMC). Diluições em série de mAb foram incubadas com várias unidades de interferões de tipo I durante uma hora a 37°C num volume total de 100:1. Estas misturas foram então incubadas com 5×10^5 células A549 em 100:1 de meio de cultura celular durante 24 horas. As células foram então provocadas com 2×10^5 pfu de vírus EMC durante mais 24 horas. No final da incubação, a viabilidade celular foi determinada através de exame microscópico visual ou coloração de violeta cristal. O título de anticorpo neutralizante (CE_{50}) foi definido como a concentração de anticorpo que neutraliza 50% do efeito citopático antiviral em 100 unidades/ml de IFN de tipo I. As unidades de IFN de tipo I utilizadas neste estudo foram determinadas utilizando IFN- γ 2 humano recombinante de referência de NIH como padrão. As actividades específicas dos vários IFN de tipo I testados foram como se segue: IFN- γ 2/1 (2×10^7 IU/mg), IFN- γ 1 (3×10^7 IU/mg), IFN- γ 2 (2×10^7 IU/mg), IFN- γ 5 (8×10^7 IU/mg), IFN- γ 8 (1×10^7 IU/mg) e IFN- γ 10 ($1,5 \times 10^5$ IU/mg). O IFN de leucócitos testado foi o Produto Sigma N.º I-2396. O IFN linfoblastóide testado foi o Ga23-901-532 de referência de NIH padrão. Os dados mostrados na Fig. 3B foram obtidos utilizando o formato de ensaio descrito acima em experiências efectuadas por Access Biomedical (San Diego, CA) a pedido do requerente.

Ensaio de alteração de mobilidade electroforética

A maioria as acções imediatas de IFN foi associada à activação de transdutores de sinal citoplasmáticos latentes e proteínas activadoras da transcrição (STAT) para produzir um

complexo multiproteico, o factor génico-3 estimulado por interferão (ISGF3), que induz a transcrição do elemento de resposta estimulado por interferão (ISRE) de um promotor alvo. ISGF3 é constituído por três subunidades proteicas: STAT1, STAT2 e p48/ISGF3. A proteína p48 pertence à família do factor regulador do interferão (IRF), e é uma proteína de ligação ao ADN que interage directamente com ISRE. Assim, a monitorização do complexo de ligação ao ADN celular específico de ISRE em resposta a tratamento de IFN proporciona um método simples, rápido e conveniente para avaliar o efeito de IFN em células alvo. Um dos formatos convenientes para realizar uma tal análise é o ensaio de alteração de mobilidade electroforética (EMSA), em que a indução de uma actividade de ligação a ISRE através de tratamento de IFN resulta na alteração na mobilidade electroforética de uma sonda oligonucleotídica de cadeia dupla radiomarcado correspondendo à sequência de consenso de ISRE.

O ensaio foi realizado essencialmente tal como descrito por Kurabayashi *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 15: 6386 (1995). Resumidamente, 5 ng de um subtipo específico de IFN- mais várias concentrações (5-100 µg/ml) de mAb anti-IFN- foram incubados com 5×10^5 células HeLa em 200 µl de DMEM durante 30 minutos a 37°C. As células foram pré-incubadas com anticorpo durante 15 minutos a 4°C antes da adição do hIFN- . As células foram lavadas em PBS e ressuspensas em 125 µl de tampão A (HEPES 10 mM, pH 7,9, KCl 10 mM, ETDA 0,1 mM, DTT 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina). Após uma incubação de 15 minutos em gelo, as células foram lisadas através da adição de NP40 a 0,025%. O sedimento nuclear foi obtido através de centrifugação e foi ressuspensão em 50 µl de tampão B (HEPES 20 mM, pH 7,9, NaCl 400 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina) e mantido em gelo durante 30 min. A fracção nuclear foi clarificada através de centrifugação e o sobrenadante armazenado a -70°C até à utilização. As sondas de cadeia dupla foram preparadas a partir de oligonucleótidos de cadeia simples (ISG15 cima: 5'-GATCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAA GCC-3' (SEQ ID NO. 13), ISG15 baixo: 5'-GATCGGCTTCAGTTTCGGTTT CCCTTTCCC-3' (SEQ ID NO. 14)) utilizando uma reacção de

preenchimento com ADN-polimerase I de Klenow com ^{32}P -dATP (3000 Ci/mM, Amersham). Os oligonucleótidos marcados foram purificados a partir de nucleótidos radioactivos não incorporados utilizando colunas BIO-Spin 30 (Bio-Rad). Reacções de ligação contendo 5 μl de extracto nuclear, 25 000 cpm de sonda marcada e 2 μg de competidor não específico poli(dI-dC)-poli(dI-dC) em 15 μl de tampão de ligação (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM e glicerol a 15%) foram incubadas à TA durante 30 minutos. Os complexos ADN-proteína foram separados em géis de poliacrilamida não desnaturante a 6% e analisados através de autorradiografia. A especificidade do ensaio foi determinada através da adição de 350 ng de sonda ISG15 não marcada em misturas reaccionais separadas. A formação de um complexo específico de ISGF3 foi confirmada através de um super-ensaio de alteração com anticorpo anti-STAT1.

Clonagem de um gene codificando o anticorpo monoclonal anti-IFN- 9F3

O mAb de murídeo anti-IFN- humano 9F3 foi gerado, clonado e sequenciado. O plasmídeo pEMX1 utilizado para expressão e mutagénese de F(ab) em *E. coli* foi descrito anteriormente (Werther *et al.*, *J. Immunol.* 157: 4986-4995 (1996)). Resumidamente, o plasmídeo contém um fragmento de ADN codificando uma cadeia leve do subgrupo 1 humano de consenso (VL I-CL) e uma cadeia pesada do subgrupo III humano de consenso (VHIII-CH1) e um promotor da fosfatase alcalina. A utilização de sequências de consenso para VL e VH foi descrita anteriormente (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289 (1992)).

Resultados

Mostrámos anteriormente que existe um amplo espectro de subtipos de IFN- expressos pelos ilhéus de pacientes com DMDI (Huang *et al.*, *Diabetes* 44: 658-664 (1995)). Demonstrámos também que não existe associação óbvia entre DMDI e a expressão de IFN- ou IFN- (Huang *et al.*, (1995) *supra*). Embora os subtipos específicos de IFN- expressos como parte da patologia de LSE não tenham sido definidos,

como para DMDI, a associação é com IFN- γ e não com IFN- α ou IFN- β (Hooks, et al., *Arthritis & Rheumatism* 25: 396-400 (1982); Kim, et al., *Clin. Exp. Immunol.* 70: 562-569 (1987); Lacki, et al., *J. Med.* 28: 99-107 (1997); Robak, et al., *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 46: 375-380 (1998); Shiozawa, et al., *Arthritis & Rheumatism* 35: 417-422 (1992); von Wussow, et al., *Rheumatology International* 8: 225-230 (1988)). Estas observações conduziram-nos à proposta de que um anticorpo candidato para intervenção terapêutica em DMDI ou LSE necessitaria de neutralizar a maioria dos subtipos de IFN- γ ao mesmo tempo enquanto deixaria intacta as actividades de outros interferões (α , β e δ) e interleucinas que possam ser necessários para a defesa do hospedeiro.

Um deles (9F3) foi capaz de neutralizar um amplo espectro de subtipos de interferão γ recombinante e foi melhor caracterizado. Tal como mostrado na Fig. 2A, 9F3 foi capaz de neutralizar a actividade antiviral de sete interferões recombinantes, IFN- γ -2, 4, 5, 8 e 10 (Fig. 2) e IFN- γ 1 e 21 (Tabela 2 e Fig. 6). Estes subtipos de IFN- γ cobrem todo o espectro de sequências projectadas num dendrograma de sequências de interferão de tipo I. Mais importantemente, o mAb 9F3 que neutralizou os subtipos de IFN- γ foi incapaz de neutralizar IFN- γ (Fig. 2, Tabela 2) ou IFN- γ . O pequeno aumento na actividade mostrada na Fig. 2 para IFN- γ não foi reproduzível noutros ensaios e parece ser o resultado de variação no ensaio.

Foram desenvolvidos outros mAb que são neutralizantes para IFN- γ (Tsukui et al., *Microbiol. Immunol.* 30: 1129-1139 (1986); Berg, J. *Interferon Res.* 4: 481-491 (1984); Meager e Berg, J. *Interferon Res.* 6: 729-736 (1986); Patente US N.º 4902618; e publicação EP N.º 0139676 B1). No entanto, estes anticorpos neutralizam apenas um número limitado de subtipos de IFN- γ recombinantes e são incapazes de neutralizar um amplo espectro de subtipos de IFN- γ tais como os produzidos por leucócitos activados. Em contraste, o mAb 9F3 foi incapaz de neutralizar pelo menos 95% da actividade antiviral na recolha heterogénea de subtipos de IFN- γ produzidos por leucócitos activados (Fig. 3A). Semelhantemente, o mAb 9F3 foi também capaz de bloquear a actividade antiviral de uma preparação independente de IFN linfoblastóide (padrão de

referência de NIH) tal como determinado numa experiência independente (Fig. 3B).

A capacidade do mAb 9F3 para neutralizar IFN- foi também testada utilizando um bioensaio alternativo. O ensaio foi baseado na capacidade de IFN- para activar a ligação da molécula de sinalização, factor génico 3 estimulado por interferão (ISGF3), a um oligonucleótido derivado do elemento de resposta estimulado por interferão (ISRE) num ensaio de ligação a ADN conhecido como ensaio de alteração de mobilidade electroforética (Horvath *et al.*, *Genes Dev.* 9: 984-994 (1995)). A transdução de sinais do interferão de tipo I para o núcleo baseia-se na activação de um complexo proteico, ISGF3, envolvendo dois transdutores de sinal e activadores de proteínas de transcrição (STAT), STAT1 e STAT2, e a proteína factor de regulação do interferão (IRF), p48/ISGF3y (Wathelet *et al.*, *Mol. Cell* 1: 507-518 (1998)). Esta última é uma subunidade de reconhecimento da sequência de ADN de ISGF3 e interage directamente com ISRE (McKendry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11455-11459 (1991); John *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11: 4189-4195 (1991)). O tratamento de células COS com IFN- ou IFN- conduziu ao surgimento de um complexo correspondendo à ligação de ISGF3 à sonda derivada de ISRE. O surgimento do complexo induzido por IFN- mas não do induzido por IFN- foi bloqueado pelo mAb 9F3 (Fig. 4). Além disso, o mAb 9F3 foi capaz de neutralizar a actividade de seis subtipos recombinantes de IFN- que foram testados neste ensaio (Tabela 2).

Tabela 2

Inibição da formação de ISGF3 induzida pelos IFN de tipo I através do mAb 9F3

mAb	IFN- 2/	IFN- 3	IFN- 4	IFN- 5	IFN- 6	IFN- 21	IFN-
9F3.18.5	+++	+++	+++	+	+++	+++	-
IgG 1	-	-	-	-	-	-	-

Está indicada a extensão da inibição do complexo induzido por IFN através de 9F3 onde - indica que a banda induzida não foi alterada; + indica que a banda foi parcialmente perdida e +++ indica que a banda induzida foi grandemente abolida. O mAb foi utilizado a 10 µg/ml; IFN- foi utilizado a 25 ng/ml.

Tendo estabelecido que 9F3 era capaz de neutralizar tanto uma ampla variedade de subtipos de IFN- recombinaentes como a mistura de subtipos de IFN- produzidos através de leucócitos activados, clonámos e sequenciámos os ADNc codificando as cadeias pesadas e leves do mAb 9F3. As cadeias pesadas e leves foram purificadas e foram utilizadas as sequências de aminoácidos N-terminais derivadas para desenhar iniciadores 5' degenerados correspondendo ao terminal N, e foram desenhados iniciadores 3' correspondendo ao domínio constante da cadeia leve de ratinho e da cadeia pesada de IgG2. Os ADNc correspondentes foram clonados utilizando a técnica de PCR convencional e foi determinada a sequência nucleotídica das inserções. A Figura 5 mostra o alinhamento de sequências dos domínios VL (5A) e VH (5B) de um anticorpo monoclonal de murídeo 9F3, a versão humanizada (V13) e a sequência de consenso da cadeia pesada do subgrupo III humano e da cadeia leve do subgrupo III humano. Para assegurar que os ADNc que foram clonados codificavam o mAb correcto reflectindo a especificidade e características do mAb 9F3, foram geradas proteínas recombinantes quiméricas que utilizaram as sequências de ADNc de ratinho mostradas na Fig. 5 e um domínio CH1 humano. A quimera resultante (CH8-2) foi capaz de neutralizar completamente vários subtipos de IFN- recombinaentes (Fig. 6). As sequências de aminoácidos para as cadeias pesadas e leves foram então utilizadas para gerar um anticorpo humanizado.

Exemplo 2. Humanização do anticorpo monoclonal neutralizante de pan-IFN- 9F3

Materiais e Métodos

Construção de F(ab) humanizados

Para construir a primeira variante de F(ab) do 9F3 humanizado, foi efectuada mutagénese dirigida ao local (Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492 (1985)) num molde contendo desoxiuridina de pEMX1. As seis CDR foram mudadas para a sequência de 9F3 de murídeo (Fig. 5); os resíduos incluídos em cada CDR foram das definições das CDR baseadas na sequência (Kabat et al., (1991) *supra*). F-1 consistiu portanto numa estrutura humana completa (VL

subgrupo 1 e VH subgrupo III) com as seis sequências de CDR de murídeo completas. Os plasmídeos para todas as outras variantes de F(ab) foram construídos a partir do plasmídeo molde de F-1. Os plasmídeos foram transformados em *E. coli* estirpe XL-1 Blue (Stratagene, San Diego, CA) para preparação de ADN de cadeia dupla e de cadeia simples utilizando estojos comerciais (Qiagen, Valencia, CA). Para cada variante, o ADN codificando para as cadeias leves e pesadas foi completamente sequenciado utilizando o método de terminação da cadeia didesoxinucleotídica (Sequenase, U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH). Os plasmídeos foram transformados em *E. coli* estirpe 16C9, um derivado de MM294, plaqueados em placas de caldo de Luria contendo 50 µg/ml de carbenicilina, e uma única colónia seleccionada para expressão proteica. A colónia individual foi criada em 5 ml de caldo de Luria-100 µg/ml de carbenicilina durante 5-8 h a 37°C. A cultura de 5 ml foi adicionada a 500 ml de meio AP5 contendo 50 µg/ml de carbenicilina e deixada crescer durante 20 h num balão de agitação de 4 L a 30°C. O meio AP5 consiste em: 1,5 g de glicose, 11,0 g de Hycase SF, 0,6 g de extracto de levedura (certificado), 0,19 g de MgSO₄ (anidro), 1,07 g de NH₄Cl, 3,73 g de KCl, 1,2 g de NaCl, 120 ml de trietanolamina 1 M, pH 7,4, em 1 L de água e depois esterilizado por filtração através de um filtro Sealkeen de 0,1 µm. As células foram colhidas através de centrifugação numa garrafa de centrífuga de 1 L a 3000 ×g e o sobrenadante removido. Após congelação durante 1 h, o sedimento foi ressuspenso em 25 ml de Tris 10 mM-EDTA 1 mM-sacarose a 20% frio, pH 7,5, 250 µl de benzamidina 0,1 M (Sigma, St. Louis, MO) foram adicionados para inibir a proteólise. Após agitação suave em gelo durante 3 h, a amostra foi centrifugada a 40000 ×g durante 15 min. O sobrenadante foi então aplicado a uma coluna de Proteína G-Sepharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Suécia) (volume do leito de 0,5 ml) equilibrada com Tris 10 mM-EDTA 1 mM, pH 7,5. A coluna foi lavada com 10 ml de Tris 10 mM-EDTA 1 mM, pH 7,5, e eluída com 3 ml de glicina 0,3 M, pH 3,0, em 1,25 ml de Tris 1 M, pH, 8,0. Foi então mudado o tampão ao F(ab) para PBS utilizando um Centricon-30 (Amicon, Beverly, MA) e concentrou-se até um volume final de 0,5 ml. Os géis de SDS-PAGE de todos F(ab) foram corridos para avaliar a pureza e o peso molecular de cada variante foi verificado através de espectrometria de massa de electrovaporização. As

concentrações dos F(ab) foram determinadas utilizando análise quantitativa de aminoácidos.

Construção da IgG Quimérica e Humanizada

Para a geração de versões IgG2 humanas do 9F3 quimérico e humanizado, os domínios VL e VH de murídeo ou humanizados apropriados (F-13, Tabela 3) foram subclonados em vetores pRK separados anteriormente descritos (Eaton *et al.*, *Biochemistry* 25: 8343-8347 (1986)) que continham ADN codificando para CH1-Fc da IgG2 humana ou o domínio CL da cadeia leve humana. O ADN codificando para a cadeia leve inteira e a cadeia pesada inteira de cada variante foi verificado através de sequenciação didesoxinucleotídica. A IgG quimérica consiste no domínio VH de 9F3 de murídeo inteiro fundido com um domínio CH1 humano no aminoácido SerH113 e no domínio VL de 9F3 de murídeo inteiro fundido com um domínio CL humano no aminoácido LysL107.

Os plasmídeos das cadeias pesadas e leves foram co-transfectados para uma linha celular de rim embrionário humano transformada com adenovírus, 293 (Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36: 59-74 (1977)), utilizando um procedimento de elevada eficiência (Gorman *et al.*, *DNA Prot. Eng. Tech.* 2: 3-10 (1990)). O meio foi mudado para meio sem soro e colhido diariamente durante até cinco dias. Os anticorpos foram purificados a partir dos sobrenadantes reunidos utilizando Proteína A-Sepharose CL-4B (Pharmacia). Foi mudado o tampão do anticorpo eluído para PBS utilizando um Centricon-30 (Amicon), concentrou-se até 0,5 ml, esterilizou-se por filtração utilizando um Millex-GV (Millipore, Bedford, MA) e armazenou-se a 4°C. As concentrações de IgG2 foram determinadas utilizando análise quantitativa de aminoácidos.

Ensaio de ligação de IFN-

No ELISA, foram revestidas placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) através da adição de 50 µl de IFN- a 0,1 µg/ml em PBS a cada poço e incubou-se de um dia para o outro a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS mais Tween 20 a 0,05%). Os poços das placas de microtitulação foram então bloqueados com 200 µl de

SuperBlock (Pierce) e incubados à temperatura ambiente durante 1 hora. As placas foram então lavadas novamente três vezes com tampão de lavagem. Após o passo de lavagem, foram adicionados aos poços designados 100 µl de diluições em série de mAb humanizado a começar em 10 µg/ml. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora num aparelho agitador e depois lavadas três vezes com tampão de lavagem. A seguir, foram adicionados a cada poço 100 µl de Fab específico de cabra anti-humano conjugado com peroxidase de rábano (HRP) (Cappel), diluído 1:1000 em tampão de ensaio (albumina de soro bovino a 0,5%, Tween 20 a 0,05% em PBS). As placas foram incubadas à temperatura ambiente num aparelho agitador e depois lavadas três vezes com tampão de lavagem, seguido da adição de 100 µl de substrato (TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; Kirkegaard & Perry) a cada poço e incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos. A reacção foi parada através da adição de 100 µl de solução de paragem (de Kirkegaard & Perry) a cada poço, e a absorvância a 450 nm foi lida num leitor de placas de microtitulação.

Ensaio de biossensor BIAcore™

A ligação de IFN- aos anticorpos F(ab) humanizados, IgG2 quimérica e humanizada foi medida utilizando um biossensor BIAcore™ (Karlsson et al., "Methods: A companion to Methods in Enzymology" 6: 97-108 (1994)). O IFN- foi imobilizado no *chip* sensor a 60 µg/ml em tampão MES 50 mM, pH 6,3. Os anticorpos foram expostos ao *chip* a 75 µg/ml (500 nM) em solução salina tamponada com fosfato/Tween-20 a 1%. A taxa de associação de anticorpo (k_{on}) foi medida.

Modelos gráficos de computador dos F(ab) de murídeo e humanizado

As sequências dos domínios VL e VH (Fig. 5A e B) foram utilizadas para construir um modelo gráfico de computador dos domínios VL-VH de 9F3 de murídeo (Fig. 7). Este modelo foi utilizado para determinar que resíduos estruturais devem ser incorporados no anticorpo humanizado. Um modelo do F(ab) humanizado foi também construído para verificar a selecção correcta dos resíduos estruturais de murídeo. A construção de

modelos foi efectuada tal como é descrito anteriormente (Carter *et al.*, (1992) *supra*; Werther *et al.*, (1996) *supra*).

Resultados

A sequência de consenso para a cadeia pesada do subgrupo III humano e a cadeia leve do subgrupo I foram utilizadas como estrutura para a humanização tal como mostrado na Fig. 5 (Kabat *et al.*, (1991), *supra*). Esta estrutura foi utilizada com sucesso na humanização de outros anticorpos de murídeo (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2623-2632 (1993); Eigenbrot *et al.*, *Proteins* 18: 49-62 (1994); Werther *et al.*, *J. Immunol.* 157: 4986-4995 (1996)). Todas as variantes humanizadas foram inicialmente feitas e pesquisadas quanto à ligação como F(ab) expressos em *E. coli*. Os rendimentos típicos de balões de agitação de 500 ml foram 0,1-0,4 mg de F(ab).

Os resíduos das regiões determinantes de complementaridade (CDR) foram definidos com base na hipervariabilidade da sequência (Kabat *et al.*, (1991) *supra*) ou na estrutura cristalina dos complexos F(ab)-antígeno (Chothia *et al.*, *Nature* 342: 877-883 (1989)). Embora as CDR baseadas na sequência sejam maiores que as CDR baseadas na estrutura, as duas definições estão geralmente de acordo excepto quanto a CDR-H1. De acordo com a definição baseada na sequência, CDR-H1 inclui os resíduos H31-H35, enquanto o sistema baseado na estrutura define os resíduos H26-H32 como CDR-H1 (os números dos resíduos da cadeia leve são prefixados com L; os números dos resíduos da cadeia pesada são prefixados com H). Para o presente estudo, CDR-H1 foi definida como uma combinação das duas, i.e. incluindo os resíduos H26-H35. As outras CDR foram definidas utilizando a definição baseada na sequência (Kabat *et al.*, (1991) *supra*).

Na variante inicial, F-1, os resíduos da CDR foram transferidos do anticorpo de murídeo para a estrutura humana. Adicionalmente, os F(ab) que consistiam na cadeia pesada quimérica com a cadeia leve de F-1 (Ch-1) e a cadeia pesada de F-1 com a cadeia leve quimérica (Ch-2) foram gerados e testados quanto à ligação. F-1 ligou-se a IFN- fracamente (Tabela 3). A comparação das afinidades de ligação de Ch-1 e Ch-2 (Tabela 3) sugeriu que era necessário que os resíduos

estruturais no domínio VH de F-1 fossem alterados para aumentar a ligação.

Tabela 3

Versões Anti-IFN- Humanizadas			DO _{450nm} a 10 µg/ml		
Versão	Molde	Alterações ^a	Média	DP	N
Ch-1	VL de F-1/VH de murídeo		1,45	0,11	3
Ch-2	VL de murídeo/VH de F-2		0,024	0,04	3
F-1	FR Humana/troca de CDR		0,06	0,00	3
F-2	F-1	ArgH71 Leu ; AsnH73 Lys	0,08	0,01	3
F-3	F-2	PheH67 Ala ; IleH69 Leu ; LeuH78 Ala	0,14	0,02	3
F-4	F-3	ArgH94 Ser	0,495	0,02	3
F-5	F-4	AlaH24 Thr	0,545	0,03	3
F-6	F-5	ValH48 Ile ; AlaH49 Gly	0,527	0,02	2
F-7	F-5	Ala H78 Leu	0,259	0,02	2
F-8	F-5	Leu H69 Ile	0,523	0,05	3
F-9	F-5	Ala H67 Phe	0,675	0,09	3
F-10	F-9	Leu H69 Ile	0,690	0,03	3
F-11	F-10	LysH75 Ser	0,642	0,06	3
F-12	F-10	AsnH76 Arg	0,912	0,05	3
F-13	F-12	LeuL46 Val ; TyrL49 Ser	1,050	0,16	3
F-14	F-13	Leu H71 Arg	0,472	0,06	3
F-15	F-13	Lys H73 Asn	0,868	0,32	3

^aOs resíduos de murídeo estão a negrito; os números dos resíduos estão de acordo com Kabat et al. (1991). O texto normal indica uma alteração de um resíduo estrutural humano para ratinho. O texto em itálico indica uma alteração de um resíduo estrutural de ratinho para humano. A ligação de Fab a IFN- foi ensaiada através de ELISA e os resultados são proporcionados como DO_{450nm} a 10 µg/ml. DP, desvio padrão; n, número de repetições experimentais.

Humanizações anteriores (Xiang et al., *J. Mol. Biol.* 253: 385-390 (1995); Werther et al., (1996) *supra*) bem como estudos de estruturas cristalinas de F(ab)-antígeno (Chothia et al., (1989) *supra*; Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215: 175-182 (1990)) mostraram que os resíduos H71 e H73 podem ter um profundo efeito na ligação, possivelmente através da influência das conformações de CDR-H1 e CDR-H2. A alteração dos resíduos humanos nas posições H71 e H73 para os seus equivalentes de murídeo melhorou apenas ligeiramente a ligação (versão F-2, Tabela 3). Outras alterações simultâneas

nas posições H67, H69 e H78 (versão F-3) seguidas de alterações ArgH94Ser (versão F-4) e AlaH24Thr (versão F-5) melhoraram significativamente a ligação (Tabela 3). Uma vez que as posições H67, H69 e H78 foram alteradas simultaneamente, cada uma foi individualmente alterada de novo para o resíduo estrutural humano de consenso; as versões F-7, F-8, F-9, e F-10 mostram que o resíduo humano é preferido na posição H67, a posição H69 não mostra qualquer preferência pelo resíduo humano ou de murídeo, e o resíduo de murídeo é preferido na posição H78.

Verificámos durante as humanizações anteriores que os resíduos numa estrutura de volta, FR-3 (Kabat *et al.*, (1991) *supra*), adjacentes a CDR-H1 e CDR-H2 podem afectar a ligação (Eigenbrot *et al.*, (1994) *supra*). Concordantemente, dois resíduos nesta volta foram alterados para os seus equivalentes de murídeo: LysH75 para Ser de murídeo (versão F-11) e AsnH76 para Arg de murídeo (versão F-12). Apenas a alteração AsnH76Arg provocou uma melhoria na ligação (Tabela 3).

A inspecção dos modelos dos F(ab) de murídeo e humanizados sugeriu que o resíduo L46, oculto na interface de VL-VH e interactuante com CDR-H3, pode ter também um papel na determinação da conformação de CDR-H3 e/ou afectando as interacções entre os domínios VL e VH. Semelhantemente, a posição L49 que é adjacente a CDR-L2 difere entre a sequência humana de consenso (Tyr) e a de 9F3 (Ser). Portanto, os resíduos LeuL46Val e TyrL49Ser foram simultaneamente substituídos, o que resultou numa variante (F-13) com mais melhoria na ligação (Tabela 3). Com base na sua melhor ligação entre todas as variantes geradas, foi escolhida F-13 como a versão humanizada final.

Um anticorpo monoclonal anti-IFN- γ recombinante humanizado (V13IgG2) foi gerado através da fusão dos domínios VH e VL derivados de F-13 com os domínios CH1-Fc de IgG2 humana e CL humano, respectivamente. As taxas K_{ON} e os valores de K_D de V13IgG2 foram então comparados com uma IgG2 quimérica ou 9F3 de murídeo. Medição por BIAcore™ da ligação de V13IgG2 e IgG2 quimérica ao IFN- γ imobilizado mostraram que as suas taxas K_{ON} eram semelhantes (Tabela 4). A medição

de afinidade utilizando tecnologia Kinexa™ mostrou que a afinidade de V13IgG2 para IFN foi reduzida em 2 vezes em comparação com o anticorpo 9F3 de murídeo parental (Tabela 4).

Tabela 4

Dados de BIACore™ e Kinexa™ para Anticorpos Anti-IFN			
Anticorpo ^a	K _{on} (μM/s)	K _d (nM) ^b	Método
		0,14	BIACore™
ChIgG2	3,9		BIACore™
V13IgG2	3,3		BIACore™
V13Fab		4,1	BIACore™
Anticorpo ^a	K _D (pM)		
9F3 de murídeo	1,5		Kinexa™
V13Fab	3,4		Kinexa™

^aV13IgG2 é o domínio VH de F-13 unido a CH1-Fc de IgG2 humana e o domínio VL de F-13 unido a um domínio CL humano; ChIgG2 é o domínio VH de 9F3 de ratinho unido a CH1-Fc de IgG2 humana e o domínio VL de 9F3 de ratinho unido ao domínio CL humano.

^bK_{off}/K_{on}.

Depósito de Material

Os seguintes materiais foram depositados na American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EUA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>Dep. ATCC</u> <u>N.º</u>	<u>Data de Depósito</u>
1. Uma linha celular de hibridoma segregando anticorpos monoclonais de murídeo anti-IFN- 9F3 (Ref. Id.: 9F3.18.5)	PTA-2917	18 de Janeiro, 2001
2. Vector baseado em pRK para a expressão da cadeia pesada da IgG inteira quimérica CH8-2 (Ref. Id.: XAIFN-ChHpDR2)	PTA-2883	9 de Janeiro, 2001

3. Vector baseado em pRK para a PTA-2880 9 de Janeiro, 2001
expressão da cadeia leve da IgG
inteira quimérica CH8-2
(Ref. Id.: XAIFN-ChLpDR1)
4. Vector baseado em pRK para a PTA-2881 9 de Janeiro, 2001
expressão da cadeia pesada da IgG₂
inteira V13 humanizada
(Ref. Id.: VHV30-IgG2)
5. Vector baseado em pRK para a PTA-2882 9 de Janeiro, 2001
expressão da cadeia leve da IgG₂
inteira V13 humanizada
(Ref. Id.: VLV30-IgG)

Este depósito foi feito sob as condições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para Fins de Procedimento de Patentes e Respectivos Regulamentos (Tratado de Budapeste). Isto assegura a manutenção de uma cultura viável do depósito durante 30 anos desde a data do depósito. O depósito será disponibilizado pela ATCC sob os termos do Tratado de Budapeste, e sujeito a um acordo entre Genentech, Inc. e ATCC, que assegura uma disponibilidade permanente e irrestrita da descendência da cultura do depósito ao após cessão da Patente U.S. pertinente ou após abertura ao público de qualquer pedido de patente U.S. ou estrangeiro, o que ocorrer primeiro, e assegura a disponibilidade da descendência a quem determinado pelo U.S. Commissioner of Patents and Trademarks a ter direito de acordo com 35 U.S.C. §122 e as regras do Commissioner nos termos do mesmo (incluindo 37 C.F.R. §1.14 com particular referência a 886 OG 638).

O cessionário do presente pedido concordou que se uma cultura dos materiais em depósito morrer ou for perdida ou destruída quando cultivada sob condições adequadas, os materiais serão prontamente substituídos após notificação por outro do mesmo. A disponibilidade do material depositado não deve ser entendida como uma licença para a prática do invento em contravenção com os direitos concedidos sob a autoridade de qualquer governo de acordo com as suas leis de patentes.

A especificação escrita anterior é considerada suficiente para permitir que um perito na especialidade ponha em prática o invento. O presente invento não deve estar limitado no seu âmbito pela construção depositada, uma vez que se pretende que a concretização depositada seja uma simples ilustração de certos aspectos do invento e quaisquer construções que sejam funcionalmente equivalentes estão dentro do âmbito deste invento. O depósito do material aqui não constitui uma admissão de que a descrição escrita aqui contida seja inadequada para permitir a prática de qualquer aspecto do invento, incluindo o seu melhor modo, nem deve ser entendido como limitante do âmbito das reivindicações às ilustrações específicas que representa. De facto, várias modificações do invento para além das aqui mostradas e descritas tornar-se-ão evidentes para os peritos na especialidade a partir da descrição anterior e caem no âmbito das reivindicações anexas.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Genentech, Inc.

<120> Anticorpos anti-interferão-alfa

<130> GENENT.074VPC

<150> EP 02742463.9

<151> 2002-01-29

<150> PCT/US02/02709

<151> 2002-01-29

<150> 60/270775

<151> 2001-02-22

<150> US 10/044896

<151> 2002-01-09

<160> 14

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Val Leu Ile Ser Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95

Gly Ile Pro Arg Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg
 100 105 110

Ala Val

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

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

Gly Ser Ile Asn Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Ser Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Met Val Ser Ala Ala Ser
 115

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<222> 1..114

<223> /nota= "descrição de sequência artificial: Esta sequência representa um anticorpo quimérico humanizado compreendendo sequências humanas e não humanas."

<400> 3

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 Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Val Leu Ile Ser Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95

Gly Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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 Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu 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 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<221> fonte

<222> 1..119

<223> /nota= "Descrição de sequência artificial: Esta sequência representa um anticorpo quimérico humanizado compreendendo sequências humanas e não humanas."

<400> 5

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

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

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

Ala Ser Ile Asn Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Ser Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

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

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

Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8
Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9
Gln His Ser Trp Gly Ile Pro Arg Thr Phe
 1 5 10

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

<400> 10
Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His
 1 5 10

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11
Ser Ile Asn Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12
Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

gatcgggaaa gggaaaccga aactgaagcc

30

<210> 14

<211> 30

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

gatcggcttc agtttcggtt tccctttccc

30

Lisboa, 2014-01-16

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal anti-IFN- que se liga a, e neutraliza, uma actividade biológica de pelo menos os subtipos de IFN- humano IFN- 1, IFN- 2, IFN- 4, IFN- 5, IFN- 8, IFN- 10 e IFN- 21, em que o referido anticorpo compete pela ligação aos subtipos de IFN- humano IFN- 1, IFN- 2, IFN- 4, IFN- 5, IFN- 8, IFN- 10 e IFN- 21 com o anticorpo monoclonal anti-IFN- humano de murídeo 9F3 produzido pela linha celular de hibridoma depositada na ATCC em 18 de Janeiro, 2001 e possuindo o n.º de acesso PTA-2917.

2. Anticorpo da reivindicação 1 que é um anticorpo de murídeo, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano.

3. Anticorpo da reivindicação 1 em que a referida actividade biológica é actividade antiviral e, opcionalmente, em que o referido anticorpo é capaz de neutralizar pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 99% da actividade antiviral dos referidos subtipos de IFN- .

4. Anticorpo da reivindicação 1 que é da classe IgG.

5. Anticorpo da reivindicação 4 que é um isotipo IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄.

6. Anticorpo da reivindicação 1 que é um fragmento de anticorpo.

7. Anticorpo da reivindicação 6 que é um fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂ ou um fragmento Fab'.

8. Molécula de ácido nucleico isolada codificando um anticorpo ou um fragmento de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. Vector compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8.

10. Célula hospedeira ou linha celular de hibridoma compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8.

11. Método de produção do anticorpo ou fragmento de qualquer uma das reivindicações 1 a 7 compreendendo a cultura de uma célula hospedeira compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo ou o fragmento sob condições em que a sequência de ácido nucleico é expressa para produzir o anticorpo ou o fragmento.

12. Composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do anticorpo da reivindicação 1 em mistura com um transportador farmacêuticamente aceitável.

13. Anticorpo ou fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-7 para utilização num método para o diagnóstico de uma condição associada à expressão de IFN- numa célula, compreendendo o contacto da referida célula com o anticorpo ou fragmento e a detecção da presença de IFN- .

14. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-4 para utilização num método para o tratamento de uma doença ou condição associadas à expressão de IFN- num paciente, compreendendo a administração ao referido paciente de uma quantidade eficaz do anticorpo, e opcionalmente em que o referido paciente é um paciente mamífero tal como o ser humano.

15. Anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 14 em que a referida doença é uma doença auto-imune, tal como uma doença seleccionada do grupo que consiste em diabetes mellitus dependente de insulina (DMID); lúpus sistémico eritematoso (LSE); e tiroidite auto-imune.

Lisboa, 2014-01-16

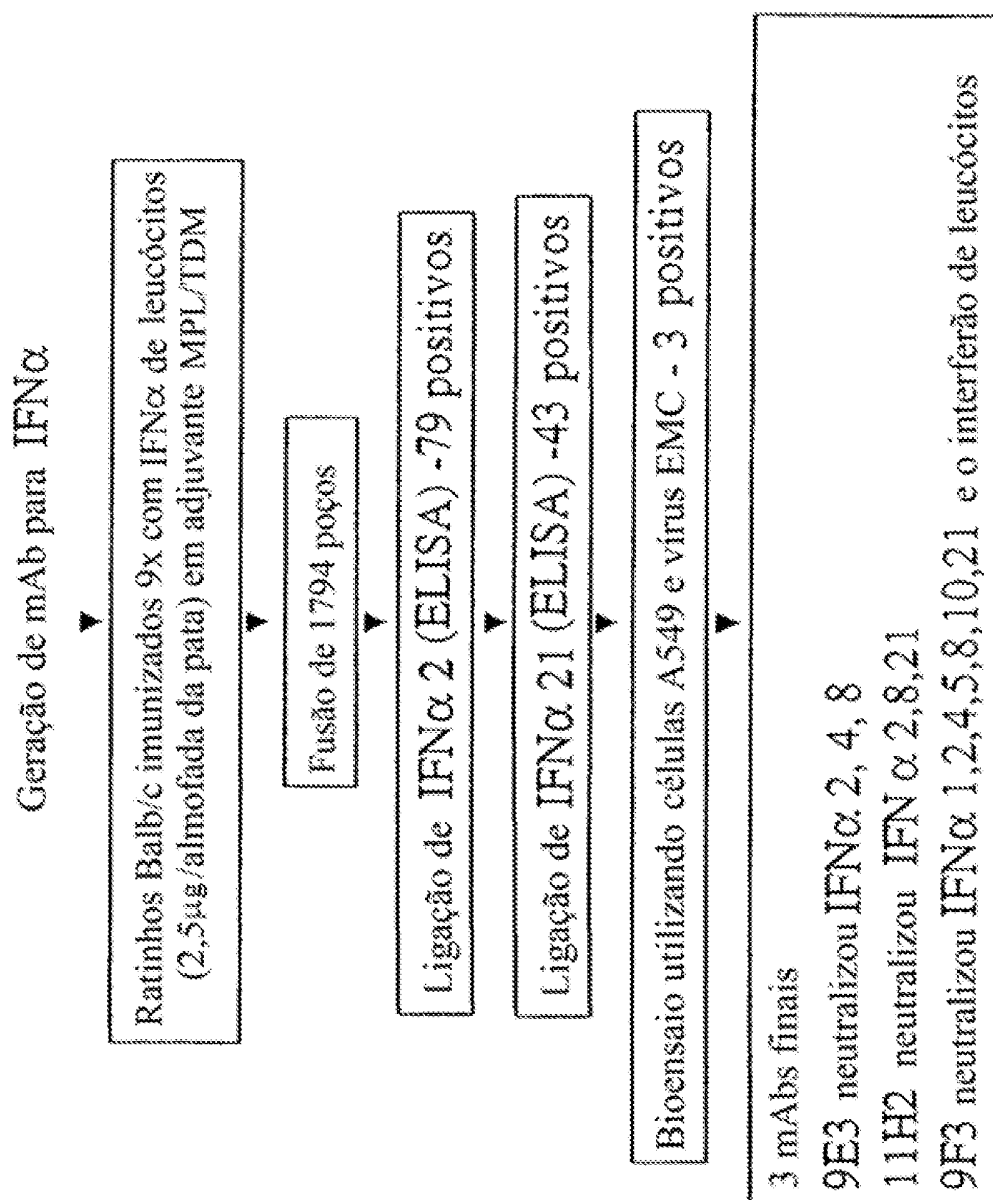


FIGURA I

Neutralização das actividades de IFN-alfa através do mAb 9F3

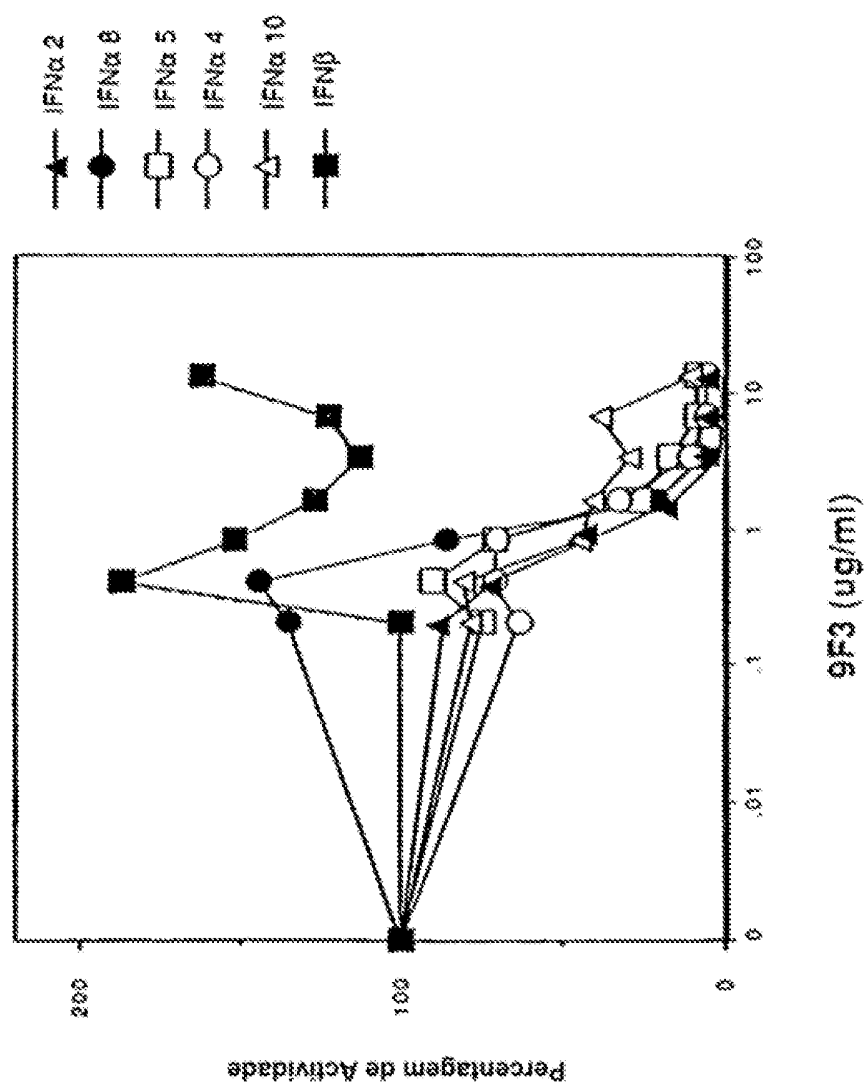


FIGURA 2

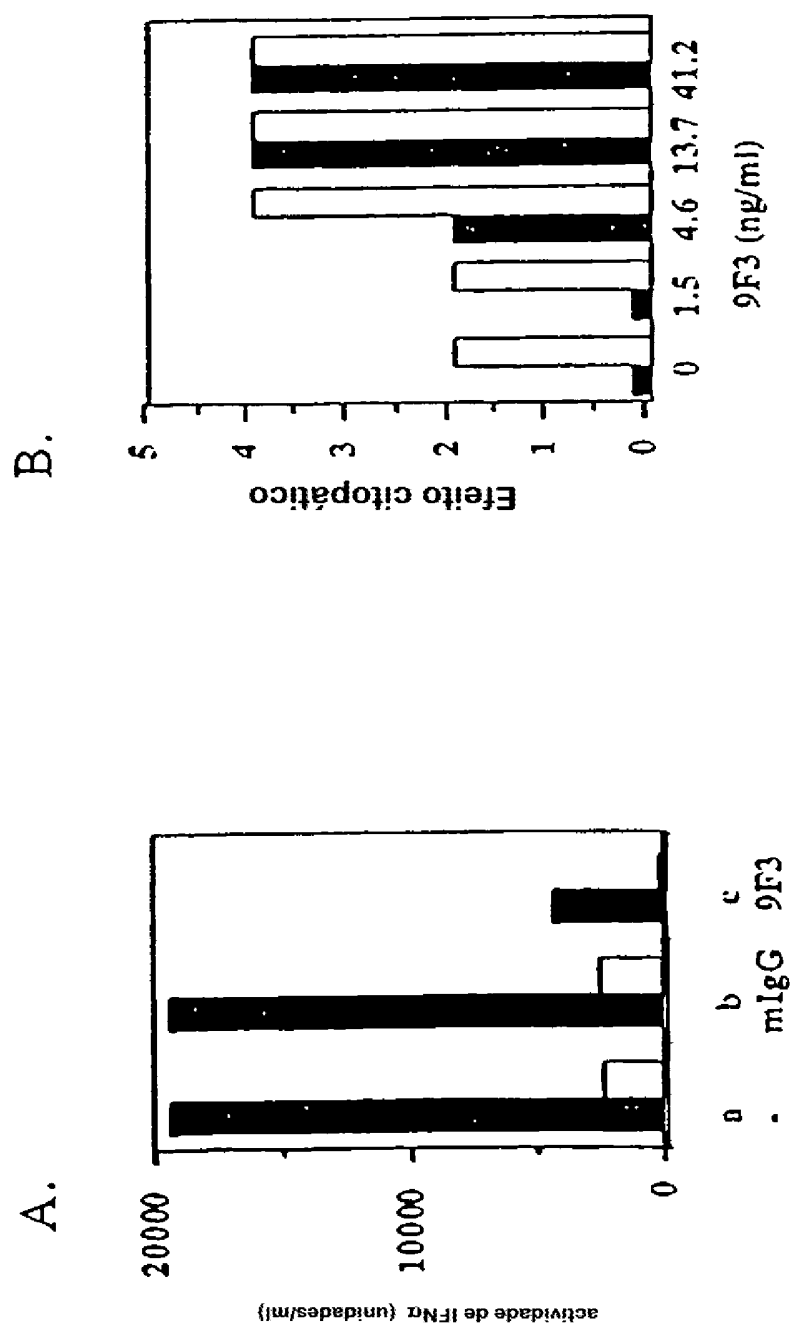


FIGURA 3

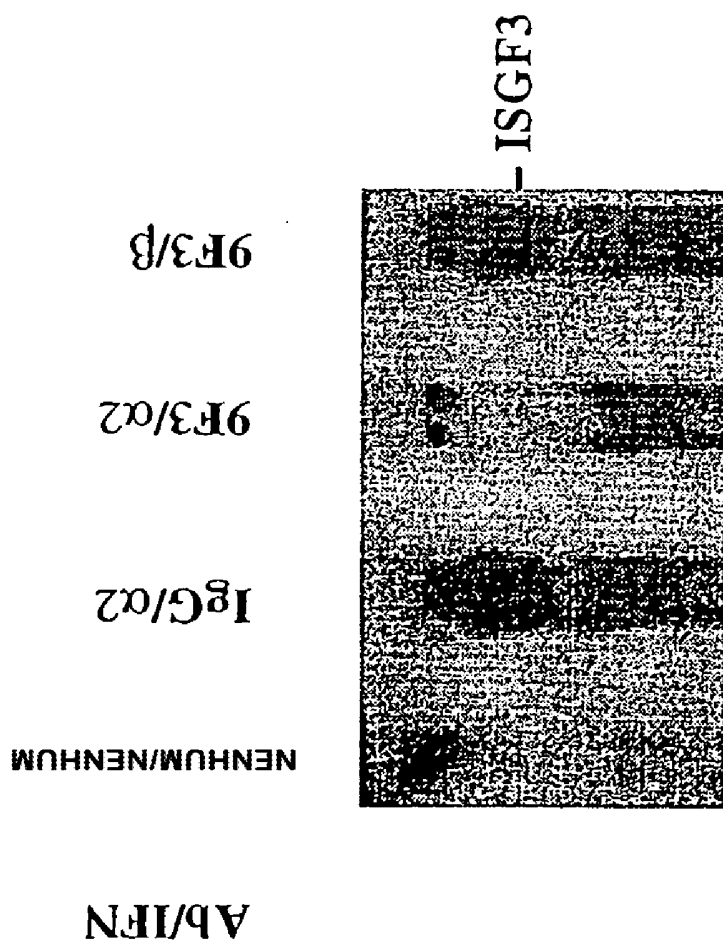


FIGURA 4

Figura 5A

Domínio Variável da Lave

	1	10	20	30	abcd	40
murideo	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKVLIS					
	** * * * * *					
V13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKVLIS					
	* * * * *					
hukI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISN---YLAWYQQKPGKAPKLLIY					

	50	60	70	80	90	
murideo	YASNLESGVPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEGDTATYFCQHSWGIPRTF					
	* * * * *					
V13	YASNLESGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSWGIPRTF					
	* * * * *					
hukI	AASSLESGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYNSLPWTF					

	100					
murideo	GAGTKLELRAV					
	* * * *					
V13	GQGTKVEIKRTV					
hukI	GQGTKVEIKRTV					

Figura 5B

Dominio Variável da Pesada

	1	10	20	30	40		
murideo	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYIIHWVKQGHGRSLEWIG						
	** ** * * *** *						
V13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYTFTEYIIHWVRQAPGKGLEWVA						
	* * ** ***						
huIII	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA						

	50	a	60	70	80	abc	90
murideo	SINPDYDITNYNQRFKKGKATLTLDKSSRTAYLELRSLTSEDSAVYYCAS						
	** ** * *** ** *						
V13	SINPDYDITNYNQRFKGRFTISLDKSKRTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAS						
	* ** *** * ***** * * * *						
huIII	VISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR						

	100						
murideo	WISDFFDYWGQGTTLMVSAAS						
	*** *						
V13	WISDFFDYWGQGLTVTVSSAS						

huIII	GRVGYDYWGQGLTVTVSSAS						

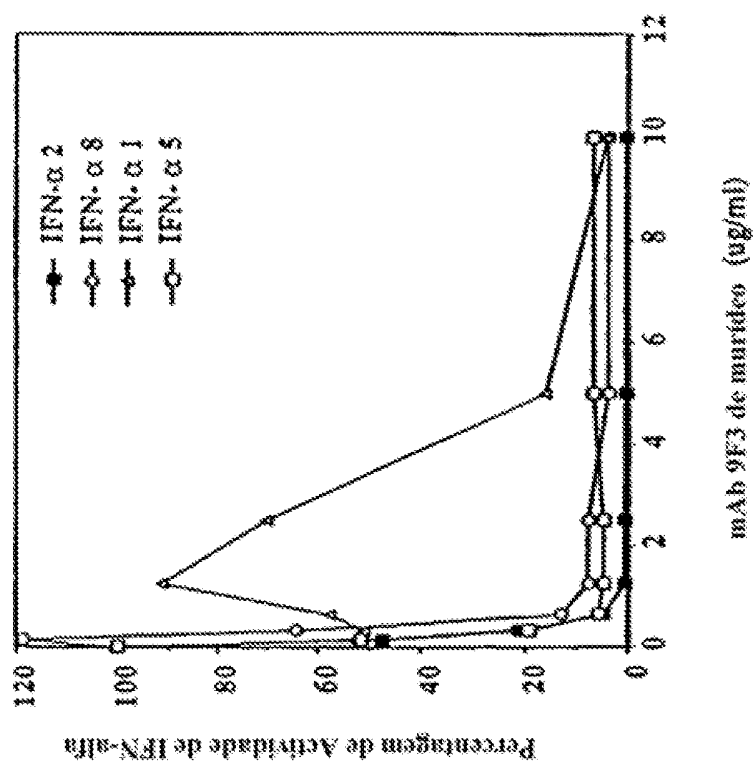
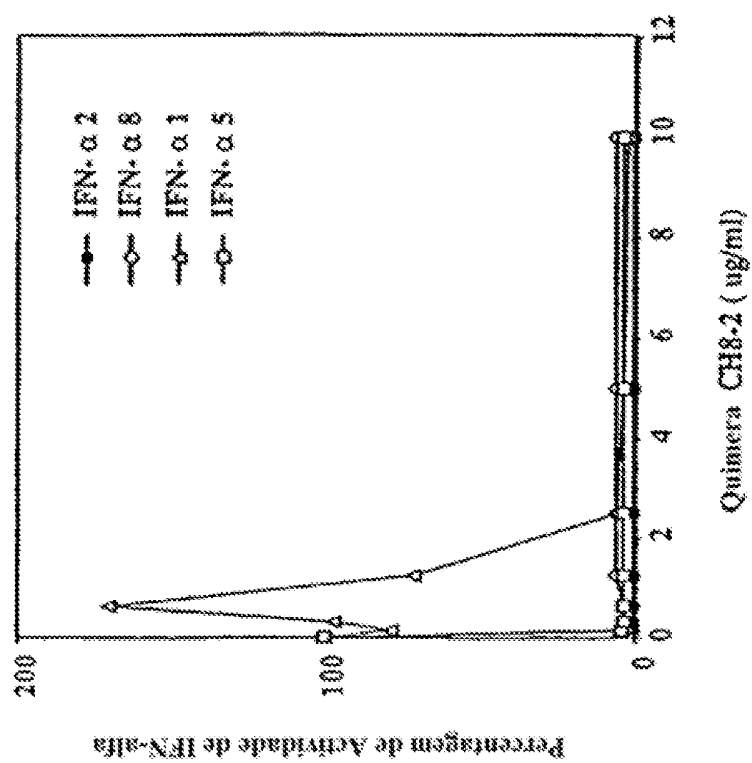


FIGURA 6

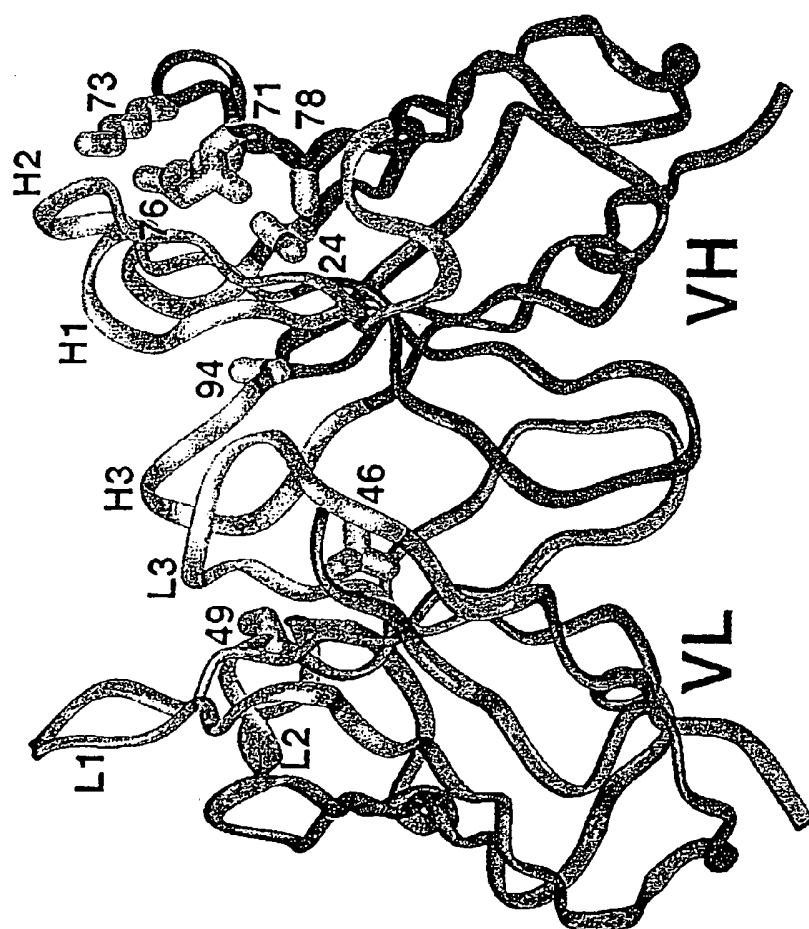


FIGURA 7