

(11) Número de Publicação: **PT 1042492 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/85 (2007.10) **C07K 16/12** (2007.10)
C07K 16/46 (2007.10) **C12N 5/10** (2007.10)
A61K 39/40 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1998.12.22**

(30) Prioridade(s): **1997.12.23 US 68635 P**
1998.12.18 US 215163

(43) Data de publicação do pedido: **2000.10.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.11.25**
005/2010

(73) Titular(es):

**HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE
ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE
SUITE 600, 1401 ROCKVILLE PIKE ROCKVILLE,
MD 20852** US
SUNOL MOLECULAR CORPORATION US

(72) Inventor(es):

HING WONG US
ALISON D. O'BRIEN US
CLARE K. SCHMITT US
ANGELA MELTON-CELSA US
JEFFREY R. STINSON US

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAL HUMANIZADOS QUE PROTEGEM CONTRA DOENÇA
INDUZIDA PELA TOXINA SHIGA**

(57) Resumo:

RESUMO

**"ANTICORPOS MONOCLONais HUMANIZADOS QUE PROTEGEM CONTRA
DOENÇA INDUZIDA PELA TOXINA SHIGA"**

REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA (SCA ANTI-STX1)

Q V Q L Q E S G A E I V R S C A S V E N	SEQ ID NO. 18
Y C D A R S S Y T T S Y X X X H W V K Q T	SEQ ID NO. 19
P G Q Q L E R I G S I I Y E S N C E T Y Y	
L Q D F P K G R A I L T A B T S S S T A Y	
N Q I S S S L T C E D S A V Y F C T R E L S	
S Y X S S D P Y E F R X N G Q C T T S T V Y S S	

REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE (SCA ANTI-STX1)

Q V I V R S Q G H K F N S T S V C D R V I I	SEQ ID NO. 20
N Q C T A S G I S D V E T A V I A W Y Q Q R F G S	SEQ ID NO. 21
S P K F L I Y K A L E S T I T G Y P D R F T	
S S G S G T D P Y L T I T R V Q S R D L A	
Y Y F C Q Q D Y S S T Y F L T F G A S T S L E	
L K B	

A presente invenção descreve a preparação e uso de anticorpos monoclonais humanizados biologicamente e imunologicamente activos para a toxina Shiga, uma toxina associada com HC e sequelas com potencial risco de vida HUS transmitida por estirpes de bactérias patogénicas. A presente invenção descreve como estes anticorpos humanizados podem ser usados no tratamento ou prevenção de doenças induzidas pela toxina Shiga. Um aspecto da invenção é o anticorpo monoclonal humanizado que se liga à toxina

Shiga onde as regiões constantes são IgG1-kappa e as regiões variáveis são de origem murina. Ainda um outro aspecto da invenção é vectores de expressão e células hospedeiras transformadas com tais vectores que expressam os anticorpos monoclonais humanizados da presente invenção.

DESCRIÇÃO**"ANTICORPOS MONOCLONais HUMANIZADOS QUE PROTEGEM CONTRA
DOENÇA INDUZIDA PELA TOXINA SHIGA"****Campo da Invenção**

Os requerentes descrevem uma família de proteínas bacterianas de unidades múltiplas que estão associadas à colite hemorrágica e sequelas com risco de vida, síndrome hemolítico-urémica. Estas proteínas, definidas como membros da "família das toxinas Shiga", são utilizadas no isolamento e identificação de anticorpos monoclonais murinos. Os requerentes ainda descrevem a construção de anticorpos monoclonais humanizados que incorporam regiões variadas em ratos. Os requerentes também descrevem anticorpos das toxinas Shiga ou toxóides, tanto monoclonais e policlonais, e seu uso no tratamento, diagnóstico e prevenção de doenças e infecções causadas por *E. coli* patogénica. É divulgada a preparação de anticorpos monoclonais humanizados para proteínas da família da toxina Shiga.

Fundamento da Invenção

A *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) está associada aos surtos de origem alimentar de diarreia

sanguinolenta ou "colite hemorrágica" (HC) e síndrome hemolítico-urémica (HWJS). (Spika, J. et al, J Pediatr., 109: 287-291 (1986); Remis, R, Ann. Intern. Med., 101:624-626 (1984); Riley, L. et al., N. Engl. J. Med., 308: 681-685 (1983)). A infecção EHEC pode ser fatal e representa uma grande ameaça para os jovens e os idosos, que são mais propensos a desenvolver complicações graves de infecções EHEC. Diversos surtos e casos esporádicos de HC e HUS tem ocorrido ao longo dos últimos anos com o maior surto nos Estados Unidos em 1993. Nesse momento, mais de 500 casos de HC e HUS foram contabilizados em hambúrgueres contaminados de uma Jackin-the Box de um restaurante "fast food". (Centers for Disease Control and Prevention, Morbid. Mortal. Weekly Rep., 42:258 (1993)). Em Julho de 1996, um grande surto de EHEC no Japão provocou mais de 10.000 pessoas infectadas e 8 mortes. Muitas crianças japonesas foram hospitalizadas.

Primeiramente, HC e HUS são transmitidos pela ingestão de comida contaminada, particularmente produtos de carne mal cozida, tais como hambúrguer. (Doble te al., J. Apple. Enviado. Microbial. 53: 2394 (1987); Sanador te al., J. Apple. Enviado. Microbial. 60: 1038 (1994)). Com a prevalência de EHEC em gado e à natureza subjetiva da diferenciação entre hambúrgueres cozidos e mal cozidos, uma parada em um restaurante "fast food" ou um churrasco com a família pode resultar em tragédia.

A HC e HUS parecem ser mediadas pela toxina

produzida pelo EHEC e *Shigella dysenteriae* (para revisão, ver O'Brien and Holmes, *Microbiol. Rev.*, 51: 206-220 (1987)). Essas bactérias produzem uma família de citotoxinas intimamente relacionadas que, colectivamente, serão chamadas de "toxinas Shiga" para efeitos do presente pedido. As toxinas Shiga (alternativamente, "verotoxinas") tem actividade citotóxica e enterotóxica (Strockbine, N. et al., *Infect. Immun.*, 53: 135-140 (1986)).

Com base na exposição de reactividade imunológica não cruzada, as toxinas Shiga foram divididas em dois grupos. (Strockbine et al., supra). Esses grupos são designados toxina Shiga do tipo 1 (Stx1) e toxina Shiga tipo 2 (stx2). O grupo Stx 1 contém a toxina Stx1 protótipo de EHEC, assim como a toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* do tipo 1. Nos últimos anos, outros tipos de toxinas foram descobertas e considerados membros do grupo Stx2. Esses são Stx2e, Stx2c e Stx2d. (Lindgren et al., *Infection and Immunology*, 61: 3832 (1993); Schmitt, C. et al., *Infect. Immun.*, 59: 1065-1073 (1991); Marques, L. et al., *FEMS Lett.*, 44: 33-38 (1987)).

Para efeitos do presente pedido, o termo "Shiga toxina" engloba toxina Shiga e quaisquer outras toxinas no grupo Stx1 ou stx2 ou suas variantes. A abreviação "Stx" se referirá à própria proteína da toxina.

Apesar do conhecimento sobre os resultados de exposição a estas toxinas, actualmente não há vacina ou

cura conhecida para a HC ou HUS. Os antibióticos podem agravar ainda mais as complicações, aumentando a liberação de toxinas a partir das bactérias. Assim, é necessário um composto para prevenir ou tratar as complicações da EHEC produzida pela toxina Shiga. Esses compostos poderiam ser usados para o tratamento em pacientes infectados e para a diminuição dos efeitos sistémicos da toxina no sistema nervoso central, sangue e rins. Além disso, se a toxina pudesse ser neutralizada, os antibióticos poderiam ser fornecidos de forma segura para matar as bactérias no trato gastrointestinal. Esses compostos também poderiam ser usados para prevenir as complicações infecciosas, ao tratar dos indivíduos expostos ou com alto risco de exposição, antes de adquirirem a infecção EHEC. Tais indivíduos incluem crianças na creche e os idosos em asilos, onde um caso de diarreia EHEC foi detectado. Esses indivíduos têm um grande risco de desenvolver complicações graves e a propagação de EHEC nestes ambientes não é incomum.

O conhecimento da reactividade cruzada imunológica das toxinas Shiga oferece uma perspectiva estimulante para métodos farmacológicos para o tratamento EHEC. Actualmente, não são conhecidos agentes profiláticos ou terapêuticos disponíveis para esta doença. Assim, é necessário que a técnica forneça anticorpos monoclonais que se liguem às toxinas Shiga que poderiam impedir ou atenuar os efeitos devastadores destas toxinas. Também há uma necessidade na técnica com relação aos dados relativos

ao sítio de ligação desses anticorpos, de forma que os anticorpos com capacidades semelhantes possam ser identificados e isolados.

Os anticorpos monoclonais para as toxinas semelhantes à Shiga são descritos em Strockbine et al. *Infection and Immunity*, 1985, 50: 695-700 e Perera, et al. *J Clinical Microbiol.*, 1988, 26: 2127-2131. Strockbine et al divulga que o uso do anticorpo 13C4 neutraliza a letalidade de ratos induzidos com toxina semelhantes à Shiga de *Escherichia coli* H30. Strockbine et al mostra ainda o uso do 13C4 para a detecção de colónias de bactérias produtoras de altos níveis de toxinas semelhantes à Shiga. Perera et al. descreve a produção de cinco anticorpos monoclonais para ratos (incluindo o anticorpo 11E10), que foram capazes de neutralizar a citotoxicidade da toxina II semelhante à Shiga. O WO9820903, publicado em 22 de Maio de 1998 descreve métodos terapêuticos para o tratamento da síndrome hemolítico-urémica, através da administração de anticorpos monoclonais, anticorpos monoclonais quiméricos e anticorpos policlonais monoespécíficos para a toxina semelhante à Shiga.

Faz-se necessário na técnica produzir anticorpos monoclonais humanizados ou quiméricos para humanos/ratos. Em estudos publicados reconhecidos, os pacientes administrados com anticorpos monoclonais murinos anti-TNF (factor de necrose tumoral) desenvolveram respostas aos anticorpos anti-murinos para o anticorpo administrado. (Ver, e. g.,

Exley A. R., et al., Lancet 335: 1275-1277 (1990)). Este tipo de resposta imune ao regime de tratamento, comumente referido como resposta HAMA (para anticorpos humanos anti-rato), diminui a eficácia do tratamento e pode até mesmo tornar o tratamento totalmente ineficaz. Os anticorpos monoclonais para ratos/humanos humanizados ou quiméricos mostraram diminuir significativamente a resposta HAMA e aumentar a eficácia terapêutica. (LoBuglio et al., P.N.A.S. 86: 4220-4224 (Junho 1989)). Métodos para humanizar anticorpos compreendem a troca de regiões constantes (ver, por exemplo, Lobuglio et al, supra) ou enxerto CDR (EP0239400)

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro anticorpo monoclonal humanizado que liga-se a proteína da toxina Shiga tipo 1 (Stx1.) e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que une-se a proteína da toxina Shiga tipo 2 (Stx2), onde o primeiro anticorpo compreende uma região constante imunoglobulina humana e compreende uma cadeia pesada da imunoglobulina e regiões variáveis da cadeia leve, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 19 e 21 e onde o segundo anticorpo compreende uma região constante imunoglobulina humana e compreende uma cadeia pesada da imunoglobulina e regiões variáveis da cadeia leve, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 42 e 44.

A presente invenção ainda se refere à composição farmacêutica compreendendo um primeiro anticorpo monoclonal humanizado que liga-se a Stx1 e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que liga-se ao抗原 Stx2, onde a região variável do segundo anticorpo compreende a região variável do anticorpo murino 11E10 com Número de Acesso ATCC CRL 1907 e a região variável do primeiro anticorpo compreende a região variável do anticorpo murino 13C4 com Número de Acesso ATCC CKL 1794.

Nas modalidades específicas das composições farmacêuticas acima descritas, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante humana selecionada do grupo constituído de IgG, IgA e IgM.

Em outras modalidades particulares das composições farmacêuticas acima descritas da região constante humana do primeiro ou segundo anticorpo monoclonal é IgG.

Em outras modalidades particulares das composições farmacêuticas acima descritas da região constante humana do primeiro ou segundo anticorpo monoclonal é IgG1-kappa.

Opcionalmente, a composição farmacêutica acima descrita inclui ainda um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

A presente invenção refere-se ainda ao uso de uma composição compreendendo um primeiro anticorpo

monoclonal humanizado que liga-se à proteína Stx1 e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que liga-se à proteína Stx2, onde o primeiro anticorpo comprehende uma região constante de imunoglobulina humana e comprehende uma cadeia pesada de imunoglobulina e regiões variáveis da cadeia leve, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 19 e 21 e onde o segundo anticorpo comprehende uma região constante de imunoglobulina humana e comprehende regiões variáveis de cadeia leve e cadeia pesada da imunoglobulina, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 42 e 42 na manufactura de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma infecção, resultando em síndrome hemolítico-urémica causada por *Escherichia coli* entero-hemorrágica ou outra toxina Shiga que produz bactérias.

A presente invenção refere-se ainda ao uso de uma composição comprehendendo um primeiro anticorpo monoclonal humanizado que liga-se a Stx1 e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que liga-se ao antigénio Stx1 e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que liga-se ao antigénio Stx2, onde a região variável do segundo anticorpo comprehende a região variável do anticorpo 11E10 murino com Número de Acesso ATCC CRL 1907 e a região variável do primeiro anticorpo comprehende a região variável do anticorpo murino 13C4 com Número de Acesso ATCC CKL 1794 na manufactura de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de uma infecção resultante em síndrome de uremia hemolítica causada *Escherichia coli* entero-hemorrágica ou outra toxina Shiga que produz bactérias.

Nas modalidades particulares, o primeiro ou segundo anticorpo comprehende uma região constante humana seleccionada a partir do grupo constituído de IgG, IgA e IgM.

Em outras modalidades particulares, a região constante humana do primeiro ou segundo anticorpo monoclonal é IgG, preferencialmente IgG1-kappa.

Para atender a essas necessidades na técnica, os requerentes fornecem anticorpos monoclonais de rato humanizados para toxina Shiga I e toxina Shiga 2 e, além disso, estabelecem a região variável associada à neutralização da toxina Shiga, bem como são fornecidas as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) específicas dos anticorpos monoclonais Humanos na região variável derivados dos anticorpos monoclonais de rato 13C4 e 11E10, que são especificamente reactivos com Stx1 e Stx2, respectivamente.

Os desenhos em anexo foram incluídos para fornecer uma melhor compreensão da invenção. Eles ilustram a invenção e, juntamente com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção.

Breve descrição das figuras

Algumas das seguintes modalidades foram incluídas apenas como referência e não foram incluídas no âmbito das reivindicações.

A figura 1 apresenta uma representação esquemática da estratégia de clonagem geral utilizada para a clonagem dos fragmentos de genes da região variável de ambos os anticorpos 11E10 e 13C4.

A figura 2 relaciona as sequências de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação PCR das regiões variáveis do anticorpo 13C4.

A figura 3 relata as sequências de consenso de DNA e aminoácidos para as regiões variáveis de ambas as cadeias pesadas e leves do anticorpo 3C4. A sequência de consenso de DNA foi determinada utilizando reacções de sequência de corantes fluorescentes autómatos de cDNAs amplificados analisados com um instrumento de sequência ABI 373. Os CDRs foram identificados de acordo com a nomenclatura de Kabat e Wu (Kabat, et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Vol. 1, 5th edition, U.S. Department of Health and Human Services) e estão localizados conforme a seguir:

CDRs de cadeia pesada: CDR 1-aa31 -35
(SEQ ID NO: 19) CDR2-aa50-66
CDR3-aa99-11

CDRs de cadeia leve: CDR1-aa24-34
(SEQ ID NO: 21) CDR2-aa50-56
CDR3-aa89-97

A Figura 4 ilustra a estratégia para a construção do vector de expressão de mamífero tKMC249A contendo as regiões variáveis do anticorpo 13C4.

A Figura 5 relaciona os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação PCR das regiões variáveis do anticorpo 11E10.

A Figura 6 relata as sequências consenso de DNA e aminoácidos para as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves do anticorpo 11E10. A sequência consenso de DNA foi determinada utilizando reacções de sequência de corantes fluorescentes automáticos de cDNAs amplificados analisados com um instrumento de sequência ABI373. Os CDRs foram identificados de acordo com a nomenclatura de Kabat e Wu (Kabat e Wu; supra) e estão localizados como a seguir:

CDRs de cadeia pesada: CDR1-aa31-35

(SEQ ID NO: 44) CDR2-aa50-66

CDR3-aa99-108

CDRs de cadeia leve: CDR I -aa24-40

(SEQ ID NO: 21) CDR2-aa56-62

CDR3-aa95-103

A Figura 7 ilustra a estratégia para a construção do vector de expressão de mamífero pACE4 contendo as regiões variáveis do anticorpo 11E10.

A Figura 8 mostra o teste ELISA da produção de anticorpos anti-Stx1 13C4 e demonstra que a linhagem de célula H13C4 produz um anticorpo que consiste em IgG humanos e domínios constantes kappa.

A Figura 9 mostra o teste ELISA da actividade de ligação da toxina anti-stx1 13C4 e demonstra que o anticorpo produzido pela linhagem de célula H13C4 liga-se à toxina Stx1.

A Figura 10 mostra o teste ELISA da produção de anticorpos anti-Stx2 11E10 e demonstra que a linhagem de célula H11E10 produz um anticorpo que consiste em domínios constantes kappa e IgG humanos.

A Figura 11 mostra o teste ELISA da actividade de ligação da toxina anti-Stx2 11E10 e demonstra que o anticorpo produzido pela linhagem de célula H11E10 liga-se à toxina Stx2.

A Figura 12 ilustra a estratégia para a construção do plasmídeo pCDNA3mut.LCPL.LCVK.

A Figura 13 ilustra a estratégia para a construção do plasmídeo pCDNA3mut.HCPL.HCV 2b.

A Figura 14 ilustra a estratégia para a construção dos plasmídeos pSUN9 e pSUN9:kappa.

A Figura 15 ilustra a estratégia para a construção dos plasmídeos PSUN10 e pSUN10:IgGI. .

A Figura 16 ilustra a estratégia para a construção do plasmídeo pJRS311. A figura 17 ilustra a estratégia para a construção do plasmídeo pJRS315.

Descrição detalhada da invenção

Os requerentes divulgam os anticorpos monoclonais humanizados que ligam-se às proteínas da toxina Shiga e o uso de tais anticorpos no tratamento ou prevenção das doenças provocadas pela toxina Shiga.

Os anticorpos são estruturas proteicas compostas de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. As cinco diferentes classes de anticorpos de vertebrados superiores - IgM, IgD, IgG, IgA e IgE são distinguidos pelas suas cadeias pesadas (mu, delta, gama, alfa e epsilon, respectivamente). Cada classe tem subclasses adicionais; IgG, por exemplo, pode ser IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ou, onde a cadeia pesada é gama 1, gama 2, gamma 3 ou gamma 4, respectivamente. O par de cadeias leves nessas classes ou subclasses pode ser kappa ou lambda. Os anticorpos são divididos ainda em uma região constante e uma região variável, tanto para as cadeias leves como pesadas, as terminações do carboxi-terminal compõem a região de sequência constante, enquanto as terminações do amino-

terminal contém regiões de sequência variável. Dentro destas regiões variáveis, estão localizadas as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que são os principais responsáveis por observar a ligação do antigénio que é característico de anticorpos.

Os anticorpos monoclonais "humanizados" significa os anticorpos monoclonais originalmente de uma fonte não humana em que os componentes humanos foram substituídos. Em particular, os anticorpos monoclonais humanizados compreendem regiões variáveis que derivam de fontes não humanas e regiões constantes que derivam de fontes humanas. Conforme estabelecido acima, as proteínas da toxina Shiga (Stx) se referem à família de proteínas bacterianas de unidades múltiplas produzidas por EHEC e *Shigella dysenteriae* que estão associados a surtos de doenças provocadas pela toxina Shiga. As proteínas da toxina Shiga devem abranger Stx de *Shigella dysenteriae* do tipo 1 e Stx do tipo 1 e tipo 2 e toxinas variante de *E. coli* do tipo 2.

As doenças provocadas pela toxina Shiga dos seres humanos incluem diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urémica e púrpura trombo-citopénica trombótica.

Os requerentes divulgam ainda os anticorpos monoclonais humanizados, que têm a mesma especificidade de ligação de pelo menos dois anticorpos monoclonais murinos bastante caracterizados. Esses dois anticorpos monoclonais

foram desenvolvidos pelo laboratório do Dr. Alison OBrien conforme estabelecido em Strockbine, N. A, et al., *Infection and Immunity*, 1985, 50: 695-700 e Perera, L. P. et al., *J. Clinical Microbial.*, 1988, 26: 2127-2131 e foram depositados no ATCC conforme estabelecido abaixo.

Por "a mesma especificidade de ligação" entende-se um nível de ligação suficientemente detectável em um ensaio de ligação para distinguir entre a ligação da toxina e ligação de base não específica como exemplificado por controlos apropriados (por exemplo, veja a Figura 9 e Figura 11). Aqueles técnicos na especialidade podem facilmente testar os níveis de ligação usando as habilidades e técnicas de rotina.

Em outra modalidade preferida, os anticorpos humanizados são caracterizados por suas características estruturais. Em um aspecto desta modalidade, a região constante é uma região constante humana e a região variável deriva de um roedor, de preferência um rato. Embora não se limitem a estes, as quatro regiões variáveis definidas no relatório, particularmente na Figura 3 e Figura 6, são os preferidos. É claro que tais regiões variáveis podem incluir modificações (isto é, supressões, adições e substituições) que não diminuem sensivelmente a ligação característica associada às regiões variáveis exemplificadas.

Em ainda outra modalidade, os CDRs da região

variável são empregados. Como mencionado acima, os CDRs estão localizados nas regiões variáveis de ambas as cadeias leves e pesadas e são responsáveis pela ligação do antígenio. Tendo em conta a habilidade daquelas pessoas versadas na técnica para determinar as regiões do CDR, a presente divulgação não se limita ao CDRs especificamente definidos. Na verdade, os vectores criados pelos requerentes e descritos em detalhes abaixo são suficientes para uso com qualquer CDRs de anticorpos não humanos para as toxinas Shiga.

Por exemplo, os anticorpos monoclonais humanizados derivados das suas regiões constantes de IgGI-kappa e suas regiões variáveis de toda ou parte das sequências, tal como estabelecido nas Figuras 3 e 6. Os vectores de expressão que codificam estes anticorpos monoclonais humanizados e as células hospedeiras que foram transformadas com essa expressão, os vectores são descritos nos exemplos. Finalmente, a invenção compreende composições farmacêuticas, tal como reivindicado e descrito no "sumário da invenção". Essas composições farmacêuticas incluem, entre outros, diluentes e transportadores conhecidos na técnica, como o soro fisiológico e soluções de sacarose apropriadas para aplicação em pacientes. Como usado aqui, os "pacientes" se referem a qualquer mamífero sensível, tais como cães, cavalos, ratos, etc., mas é especialmente preferido para seres humanos.

Os métodos de tratamento que envolvem a adminis-

tração de uma quantidade terapeuticamente eficaz, bem como uma quantidade profilaticamente eficaz do anticorpo monoclonal humanizado. Como aqueles versados na técnica reconheceriam, uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma dose que melhora o edema, trombocitopenia e uremia associada ao HUS mediado pelo EHEC. Da mesma forma, uma quantidade profilaticamente eficaz é uma dose que impede que indivíduos estejam expostos ao desenvolvimento destes sintomas.

Os seguintes exemplos ilustram as modalidades específicas da invenção. Alguns destes exemplos foram incluídos apenas para referência e não se enquadram no escopo das reivindicações.

Humanização do anticorpo anti-Stx1 13C4

Os seguintes exemplos 1-3 se referem ao anticorpo anti-Stx1 13C4 e sua contraparte humanizada H13C4.

EXEMPLO 1. Clonagem de cDNAs da região variável 13C4.

A célula de hibridoma que produz o anticorpo "13C4" (Anti-Stx1) foi depositado em 02 de Dezembro de 1987, na American Type Culture Collection, Rockville, MD sob o no. CRL 1794 e pode ser obtido a partir do ATCC ou, como aqui, do Dr. Alison O'Brien (para mais detalhes da preparação de hibridoma, ver Strockbine, N. A. et al., *Infection and Immunity*, 50: 695- 700 (1985)). Um frasco de

células foi descongelado e ressuspenso em 1MDM (Mediatech) completo meio complementado com 10% FBS (Irvina).

O RNA total foi isolado de 1×10^7 células "13C4" utilizando o kit de isolamento Midi RNA (Qiagen) seguindo os procedimentos do fabricante. O RNA foi dissolvido em 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA (pH 8.4) que contém um Inibidor RNase Prime de 0,03 U/ μ g (S'-3') a uma concentração final de 0,25 μ g/ μ l.

A Figura 1 mostra a estratégia de clonagem de fragmentos de gene da região variável e a Figura 2 relaciona os "primers" de oligonucleotídeos utilizados. O RNA "13C4" total (2 μ g) foi convertido em cDNA ao utilizar Transcriptase Reversa Superscript II-MMLV (Life Technologies) e priming específico kappa de rato (oKA57, SEQ ID NO: 57) e CH1 de rato (JS300, SEQ ID NO: 6) de acordo com os procedimentos do fabricante. Os produtos de síntese do DNA da primeira tira foram purificados utilizando um dispositivo concentrador de membrana (Amicon Centricon 30 ou Millipore UltraFree 15). Do DNA recuperado, 3 microlitros foram utilizados como DNA molde para o PCR. As reacções de amplificação de PCR típicas (100 μ l) continham DNA padrão, 50 pmoles dos "primers" apropriados (JSS9, JSS10, JSS1 I, JSSI2, JS153 & JSSI54-SEQ TD NO: 9-12 para cadeias leves; JSS1, JSS2, JSS3, JSS4, JSSS e aKA-143SEQ >D NO: 1-5 e SEQ ID NO: 15 para cadeias pesadas), 2,5 unidades de polimerase ExTaq (PanVera), tampão de reacção Ix IxTaq, 200jM dNTP e 2mM MgCl₂. Cada molde foi

desnaturado por uma incubação inicial a 96°C durante 1 min. Os produtos da cadeia pesada foram amplificados por 40 ou 50 ciclos térmicos de 59 a 72°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e depois 96°C para 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos da cadeia leve foram amplificados por 6 ciclos térmicos de 46, 48 ou 54°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e depois 96°C para 1 minuto. Seguido de 35 ciclos de etapas de 60°C para 1 minuto e depois 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR a partir de reacções bem sucedidas foram purificados utilizando o sistema de purificação de PCR Wizard (Prornega), conforme procedimento do fabricante.

Os produtos da cadeia leve e cadeia pesada de PCR (aproximadamente 400 bp) foram, em seguida, clonados dentro do vector bacteriano para a determinação da sequência de DNA. As ligações dos fragmentos de PCR foram realizadas no vector de clonagem tipo pCR2.1 T/A (Invitrogen) seguindo os procedimentos do fabricante e utilizando 1:1, 3:1 e 5:1 de razões molares inserto para vector. Metade de cada reacção de ligação foi utilizada para transformar as células azuis XLI competentes.

Os clones de plasmídeo de cadeia pesada contendo insertos de DNA foram identificados utilizando enzimas de restrição de diagnóstico digeridas com EcoRI (New England

Biolabs). A sequência de DNA de plasmídeos (tKMC217B) contendo inserções de tamanho adequado (PA 400) foi, então, determinada. A sequência consenso de DNA final de regiões variáveis de cadeia pesada é mostrada na Figura 3. Os produtos PCR de cadeia leve foram identificados diferentemente. A linhagem de célula de hibridoma que expressa o anticorpo "13C4" foi feita pela fusão de esplenócitos de ratos com a linhagem de célula de mieloma SP2/0. A linhagem de célula SP2/0 transcreve um pseudogene para a cadeia leve kappa. A transcrição pseudogene, quando convertido o cDNA pelo RT-PCR, contém um sítio de restrição AflIII. Os clones candidatos de cadeia leve (tKMC226 & 227) foram digeridos com AflIII (New England Biolabs) utilizando os procedimentos do fabricante para identificar os clones que contém insertos de tamanho apropriado (403 bp; nenhum sítio AflIII está presente nesses produtos). A sequência consenso do DNA final das regiões variáveis da cadeia leve é mostrada na Figura 3 com os CDRs indicados pelo sublinhado.

EXEMPLO 2. Construção do vector de expressão tKMC249A.

As regiões variáveis da cadeia pesada e leve foram subclonadas em vectores de plasmídeos de expressão de mamífero para a produção de moléculas de anticorpos humanos/ratos quiméricos recombinantes. Os vectores resultam na produção de moléculas de anticorpos recombinantes sob o controlo de promotores transcricionais de CMV. As moléculas de cadeia pesada são construções de cDNA

directas que misturam uma sequência de região variável no domínio constante IgG1 humano. As moléculas de cadeia leve, por outro lado, tem uma região intrão kappa 3' do rato do fragmento de codificação de região variável. Após a união, a região variável torna-se fundido a um exão da região constante kappa humanos (Figura 4). O marcador de selecção para o vector em células de mamíferos é aminoglicosídeo fosfotransferase (NEO), usando a droga G418 (CellTech).

A. Criação dos vectores de expressão

Para criar os vectores da expressão de cadeia pesada e leve exigido nas ligações de fragmento de DNA e nos passos da mutagénese dirigida no sítio. O resultado foi vectores que expressam tanto as cadeias de anticorpos com a transcrição direccional de promotores de CMV. A resistência da neomicina serve como um marcador dominante seleccionável para transfecção de células de mamíferos. Além disso, esses vectores foram projectados para permitir a clonagem conveniente de qualquer região variável da cadeia leve como um fragmento EcoRV/BstBI, qualquer região variável da cadeia pesada como um fragmento NruI/EcoRI e qualquer domínio constante de cadeia pesada como um fragmento EcoRI/NotI. Estes sítios de restrição foram escolhidos porque eles raramente (ou nunca) ocorrem em regiões variáveis em humanos e ratos. Há um fragmento região J/intrão kappa de rato fundido a um exão kappa humano, para que após a união pós-transcricional, um rato de cadeia leve kappa quimérico humano seja produzido. Por

último, os vectores foram projectados para facilitar a excisão (BglII/NheI) de um todo cassete de expressão de anticorpos de um vector para ser ligada a um corte de segundo vector com BamHI/NheI, criando um vector de expressão com o aparelho para ambas as cadeias.

A espinha dorsal do vector era plasmídeo pCDNA3 (Invitrogen). Este plasmídeo foi cortado com HindIII/Xhol e um fragmento de DNA "poliligante de cadeia leve" foi inserido para criar o inicio do "vector de cadeia leve" pCDNA3.LCPL (ver figura 12). Este ligante contido nos locais de restrição HindIII, KpnI, ClaI, PmlI, EcoRV, XmaI, BamHI e Xhol para facilitar os passos de clonagem subsequente. Um fragmento de DNA SmallBcII contendo um líder de cadeia leve, fragmento da cadeia leve kappa anti-CKMB de rato e 3'UTR foi clonado em locais EcoRV/BamH1 de pCDNA3.LCPL. O intrão, exão e 3'UTR kappa do rato neste fragmento foi derivado de LCPXK2 recebido do Dr. Richard Near (Near, *et al.*, 1990, Mol. Immunol. 27: 901-909). A mutagénese foi, então, realizada para eliminar um NruI (209), MluI (229) e BstBI (2962) e para introduzir um NheI (1229) e um BamHI (1214) sítio para criar um plasmídeo pCDNA3mut. LCPL. LCVK (ver Figura 12).

Um segundo "vector de cadeia pesada" pCDNA3tnut.HCPL foi construído a partir do plasmídeo pCDNA3mut.LCPL.LCVK pela substituição da região de expressão de cadeia leve (HindIII/Xhol) com um "poliligante de cadeia pesada" que consiste em sítios de

restrição Hpal, BspEI, EcoRV, KpnI e Xhol. Este plasmídeo foi digerido com EcoRV e KpnI. Um fragmento de DNA digerido com SmaI/KpnI contendo um líder de cadeia pesada e um fragmento genómico de cadeia pesada de rato anti-CB IgG2b foi então ligado a um plasmídeo digerido com EcoRV/KpnI. Um fragmento de oligonucleotídeo KpnI/SalI contendo um 3'UTR e um NotI a montante do sítio SalI foi posteriormente clonado no plasmídeo digerido KpnI/Xhol, (destruindo o sítio Xhol), para criar o plasmídeo pCDNA3mut.HCPL.HCV2b (ver Figura 13).

Um domínio constante da cadeia leve kappa humana foi, então, clonado em pCDNA3mut.LCPL.LCVK como um fragmento EcoNI/Xhol que gera o plasmídeo tKMC I 80C2. Um domínio constante IgGI humano foi clonado no PSLTN 10 como fragmento EcoRI/NotI que cria um plasmídeo pJRS313. As regiões variáveis de 13C4 foram clonadas dentro desses dois vectores (conforme descrito acima). Um fragmento BglII/NheI do vector de cadeia pesada humana tKMC229C foi então clonado no vector de cadeia leve humano tKMC231 D corta o BamHI/NheI para criar o tKMC249A (ver Figura 4).

B. Subclonagem das regiões variáveis nos vectores de expressão

Os fragmentos do gene da região variável foram reamplificados por PCR utilizando "primers" que se adaptam aos fragmentos para clonagem nos vectores de expressão (ver Figuras 2 e 4). O "primer" frontal de cadeia pesada

(oKAI43, SEQ ID NO: 15) inclui uma cauda 5' que codifica o C-terminal do líder de cadeia pesada e um sítio de restrição NruI para clonagem, enquanto o "primer" reverso de cadeia pesada (oKA144, SEQ ID NO: 14) adiciona um sítio de restrição 3' EcoRI para clonagem. O "primer" frontal de cadeia leve (oKA145, SEQ ID NO: 16) introduz um sítio de restrição EcoRV no N-terminal da região variável da cadeia leve para clonagem, enquanto que o "primer" reverso de cadeia leve (oKAI46, SEQ ID NO: 17) adiciona uma sequência de DNA 3' para a unir a junção dividida de exão da região-kappa seguida pelo sítio de restrição BstBl para clonagem.

As reacções de PCR foram realizadas com reagentes como descrito acima e com modelos de plasmídeo digerido com 1-2 ng de Pvul (New England Biolabs); cada um destes modelos desnaturado por uma incubação inicial de um minuto a 96°C. Os produtos da cadeia pesada foram amplificados por 35 ciclos térmicos de 55 ou 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, depois 96°C por 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da cadeia leve foram amplificados por 8 ciclos térmicos de 55 ou 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, depois 96°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de etapas de 60°C por 1 minuto e depois 96°C por 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

O produto de PCR de cadeia pesada 13C4 (cerca de 400 pb) foi purificado usando colunas de purificação PCR Qiaquick (Qiagen), como descrito nas instruções do

fabricante e posteriormente digerido com EcoRI e NruI (New England Biolabs). Os produtos de PCR digeridos foram purificados utilizando o sistema de purificação de PCR Wizard (Promega), conforme procedimento do fabricante e ligados a NruI/EcoRI digerido e purificado por gel pJRS313, resultando em plasmídeo tKMC229C (Figura 4). A sequência consenso final do DNA da região variável da cadeia pesada e a divisão adequada dos sítios de restrição foram confirmadas neste constructo.

O produto PCR de cadeia leve 13C4 (aproximadamente de 350bp) foi purificado usando colunas de purificação PCR QiaQuick (Qiagen), como descrito nas instruções do fabricante e posteriormente digerido com EcoRV e BstBI (New England Biolabs). Os produtos de PCR digerido foram purificados usando colunas de purificação QiaQuick PCR (Qiagen), conforme procedimento do fabricante e ligados em EcoRVIBstBI digerido e purificado por gel tKMC180C2 (como descrito acima), resultando no plasmídeo tKMC231D (ver Figura 4). A sequência consenso final de DNA da região variável de cadeia leve e a divisão adequada dos sítios de restrição foram confirmadas neste constructo.

EXEMPLO 3. Produção estável do anticorpo quimérico recombinante 13C4 em humanos/ratos.

A. Transfecção das células NSO

O plasmídeo tKMC249A foi transfetado em células

NSO (Baxter International, Inc., Durant, CA), utilizando electroporação após linearização com PvuI (New England Biolabs). 40 microgramas do plasmídeo digerido foram misturados com 1×10^7 células em um volume total de 800 microlitros em uma cuveta de 0,4 centímetros e submetidos a um pulso de 250mA, 960 μ F. As células foram colocadas após 24 horas em placas de cultura de tecido 96 poços, 6 placas com 200 μ l/poço e incubadas a 37°C e 10% de CO₂. Conforme as colónias aparecem, os sobrenadantes foram analisados para a produção de anticorpos "humanizados" e para a capacidade do anticorpo expresso para ligar-se ao Stx1.

B. Ensaio para a produção de anticorpos

A produção de anticorpos e os testes de actividade para os transfectantes estáveis foram realizados conforme descrito abaixo. Estes ensaios demonstram que a transfecção de células com este constructo de plasmídeo pode resultar na produção de uma linhagem de célula estável, que produz uma versão quimérica humanizada do anticorpo hibridoma 13C4 de mouse (designado H13C4).

Ensaios ELISA na produção de anticorpo foram executados em tiras de 8 poços de placas de microtitulação de 96 poços (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) cobertas a uma diluição 1:500 com anticorpo IgG Cabra anti-humano (Pierce ou Biodesign International) usando um tampão de revestimento Tris-HCl, pH 8,5. As placas foram revestidas e incubadas durante a noite a 4°C. As placas foram, então,

lavadas uma vez com um tampão de armazenamento "rash" (Tris-HCl/NaCl /0,1% NaN₃). 50 microlitros de sobrenadante de cultura foram aplicados, então, a cada poço que havia sido previamente preenchido com 50 microlitros de um diluente amostra/conjugado (Tris-HCl/NaCl/gelatina/Tween-20). As placas foram deixadas incubar durante 30 a 60 minutos em um girador a temperatura ambiente. Elas foram lavadas três vezes, então, com uma solução de lavagem (imidazola/NaCl/Tween-20). Um conjugado cabra anti-humano kappa-HRP (Southern Biotechnologies) foi diluído a 1:250 no diluente amostra/conjugado e 100 microlitros foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas em um girador durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Elas foram lavadas 6 vezes usando o tampão de lavagem e, então, incubadas com 100 μ L/poço de substrato de revelação ABTS (Kirkgaard & Perry Laboratories) durante 8 minutos a temperatura ambiente. A reacção foi paralisada com 100 μ L/poço de tampão Quench diluído (Kirkgaard & Perry Laboratories). O valor de absorvência a 405 nm foi determinado usando um leitor ELISA de placa de microtitulagem autómato (Ceres UV900HI, Bioteck, Winooski, Vermont). Os controlos para o ensaio ELISA foram seja uma proteína de mieloma IgG1K humana (Biodesign International) e sobrenadante colectado de células NOS não transfectadas. Este ensaio (veja Figura 8) demonstra que a transfecção de células com este constructo de plasmídeo faz com que as células produzam uma molécula que contém tanto cadeia pesada humana (IgG) e domínios de cadeia leve (kappa).

Os sobrenadantes foram ensaiados, então, quanto a habilidade dos anticorpos expressados para ligar a proteína Stx1 por ELISA. Os ensaios de actividade foram conduzidos em tiras de 8 poços de placas de microtitulagem de 96 poços (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) revestidas com aproximadamente 0,1 μ g/poço de Stx1 recebida de Alison O'Brien (ou obtida como descrito no Exemplo 7). O revestimento da placa e o procedimento ELISA foram conduzidos da mesma maneira que o ensaio de anticorpo acima com a substituição de TMB (Kirkgaard & Perry Laboratories) por ABTS como um substrato de revelação. O valor de absorvência a 450 nm foi determinado usando um leitor ELISA de placa de microtitulagem autómato (Ceres UV900HI, Bioteck, Winooski, Vermont). Como um controlo positivo, o anticorpo monoclonal de rato original 13C4 foi usado e ensaiado com um conjugado IgG cabra anti-rato (Jackson Laboratories) a uma diluição 1:2000. Este ensaio (veja Figura 9) demonstra que a transfecção de células com este constructo de plasmídeo faz com que as células produzam imunoglobulina que liga-se a Stx1. Nem IgG I K de rato nem humana carecendo da região variável anti-Stx ligaram-se à toxina.

Humanização do anticorpo EHEC Anti-Stx2: 11E10

Os exemplos 4-7 a seguir referem-se a anticorpo variante anti-Stx2 e -Stx2 11 E10 e sua contraparte humanizada H11E10.

EXEMPLO 4. Clonagem dos cDNAs de região variável 11 E 10.

A linhagem de célula de hibridoma que produz o anticorpo (Anti-Stx2) "11E10" foi depositada no dia 1 de Agosto de 1990, na American Type Culture Collection, Rockville, MD sob o número de acesso CRL 1907, e pode ser obtida de ATCC ou, como aqui, de Dr. Alison O'Brien (para detalhes de preparação de hibridoma, veja Perera, L. P. et al., *J. Clinical Microbiol.*, 26: 2127-2131 (1988)). Um frasco da linhagem de célula foi descongelado, lavado com meio isento de soro e, então, ressuspensos em meios completos IMDM (Mediatech) suplementados com 10% FBS (Irvine).

ARN total foi isolado de 1×10^7 células "11E10" usando o kit de Isolamento de RNA RNeasy (Qiagen) de acordo com o procedimento do fabricante. O RNA foi dissolvido em Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM (pH 8,4) contendo 0,03 U/ μ g de Inibidor Prime RNase (5'-3') a uma concentração final de 0,63 μ g/ μ L.

A Figura 1 apresenta a estratégia para clonagem dos fragmentos de gene da região variável e a Figura 5 relaciona os "primers" de oligonucleotídeo usados. O RNA total "11E10" (2,5 μ g) foi convertido a cDNA usando Transcriptase Reversa Superscript 11-MMLV (Life Technologies) de acordo com os procedimentos do fabricante. A cadeia leve do rato (JS153, JS154, SEQ ID NO: 11 e 12) e a cadeia pesada de rato (JS300, SEQ ID NO: 6) foram usadas

como "primers" específicos. Os primeiros produtos de síntese de cDNA de filamento foram, então, purificados usando um dispositivo concentrador Centricon-30 (Amicon). Dos 70 μ L de cDNA recuperados, 3,5 μ L foram usados como DNA modelo para PCR. As reacções de amplificação de PCR típicas (100 μ L) continham DNA modelo, 50 pmoles dos "primers" apropriados (JS153, JS154 e JS009, JS010, JS011, JS012, SEQ ID NO: 7-12 para cadeias leves, JS160, JS161, JS162 e JS001, JS002, JS003, JS004, JS008, SEQ ID NO: 28-10 30, SEQ ID NO: 2-5 para cadeias pesadas), 2,5 unidades de ExTaq polimerase (PanVera), 1x tampão de reacção ExTaq, dNTP 200 μ M e MgCl₂ 2mM. O modelo foi desnaturado por uma incubação inicial de cinco minutos a 96°C. Os produtos foram amplificados por 35 ciclos térmicos de 96°C durante 1 minuto, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos, seguidos por 5 minutos a 72°C. Os produtos PCR das reacções bem sucedidas foram purificados usando o sistema Wizard PCR Purification (Promega) conforme o procedimento do fabricante.

Os produtos PCR de cadeia pesada (aproximadamente 400 bp) e os produtos PCR de cadeia leve (aproximadamente 350 bp) foram, então, clonados em um vector bacteriano para determinação de sequência de DNA. As ligações dos fragmentos de PCR foram levadas a cabo no vector de clonagem tipo pCR2.1 T/A (Invitrogen) de acordo com os procedimentos do fabricante usando uma razão molar inserto para vector de 3:1. Dois μ L das reacções de ligação foram usados para transformar as células

competentes INVaF' (Invitrogen) conforme o procedimento do fabricante. Foram identificados clones de plasmídeo contendo insertos de DNA usando digestões de enzima de restrição de diagnóstico, com EcoRI (New England Biolabs). A sequência de DNA de plasmídeos contendo os insertos de cadeia pesada do tamanho apropriado (400 bp) foi, então, determinada. Os sequência de DNA final de consenso da região variável de cadeia pesada 11E10 é mostrada na Figura 6 com CDRs indicados por sublinhando.

Os clones de plasmídeo de cadeia leve precisaram mais adiante ser caracterizados porque a linhagem de célula de hibridoma que expressa o anticorpo "11E10" foi feita fundindo esplenócitos de rato com células de mieloma SP20. A linhagem de células SP20 transcreve um pseudogene para a cadeia leve kappa. O transcripto de pseudogene, quando convertido a cDNA por RT-PCR, contém um sítio de restrição AflIII. Por esta razão, os clones de plasmídeo para a região variável de cadeia leve foram digestões com AflIII e esses produtos que não cortaram foram submetidos, então, a sequenciamento de DNA. A sequência final de consenso da região variável de cadeia leve é mostrada na Figura 6, com os CDRs indicados sublinhados.

Os fragmentos de gene da região variável foram reamplificados por PCR usando "primers" que adaptaram os fragmentos para clonagem no vetor de expressão (veja Figuras 5 e 7). O "primer" frontal da cadeia pesada (11E10HF, SEQ ID NO: 37) inclui uma extremidade 5' que

codifica o C-término do líder de cadeia pesada e um sítio de restrição NruI para clonagem, enquanto o "primer" reverso de cadeia pesada (11E10HB, SEQ ID NO: 38) adiciona um sítio de restrição 3'EcoRI para clonagem. O "primer" frontal de cadeia leve (11E10LF, SEQ ID NO:39) inclui uma extremidade 5' que codifica o C-terminal do líder de cadeia leve e um sítio de restrição EcoRV no N-terminal da região variável da cadeia leve para clonagem, enquanto o "primer" reverso da cadeia leve (11E10LB, SEQ ID NO: 40) adiciona uma sequência 3'DNA para a união da junção da emenda exão da região-kappa seguida por um sítio de restrição BstBI para clonagem. PCRs foram efectuadas como descrito acima excepto que, seguindo uma incubação de 5 minutos a 96°C, os parâmetros de PCR foram 30 ciclos térmicos de 96°C durante 1 minuto, 62°C durante 30 segundos e 70°C durante 30 segundos, seguidos por 5 minutos a 72°C.

O produto PCR da região variável da cadeia pesada foi, então, subclonado em um vector de plasmídeo de expressão mamífero (pJRS315, produzido como explicado abaixo no Exemplo 5) para produção de moléculas de anticorpo rato/humano quiméricas recombinantes. O clone de vector resultante foi designado pACE1. Antes da região variável da cadeia leve poder ser subclonada no vector de expressão mamífero, ela foi subclonada no vector de clonagem tipo pCR2.1 T/A descrito previamente. O plasmídeo resultante foi designado pACELC e digerido com BstBI/EcoRV para recortar a região variável da cadeia leve. A região variável foi, então, subclonada no vector de expressão

mamífero que contém a região variável de cadeia pesada "11E10" (pACE1). O clone do vector de expressão final foi designado pACE4. Este vector resulta na produção de moléculas de anticorpo recombinantes sob o controlo dos promotores transcripcionais CMV. As moléculas de cadeia pesada são construções de cDNA directas que fundem a sequência da região variável directamente no domínio constante IgG1 humano. Por outro lado, as moléculas de cadeia leve têm uma região de intrão kappa de rato 3' do fragmento de codificação da região variável. Depois de emendar, a região variável fica fundida a um exão da região constante kappa humana (veja Figura 7). O marcador relacionável para o vector em células de mamífero é neomicina (G418).

Para a produção de pACE1, o produto PCR de cadeia pesada "1E10" (aproximadamente 400 bp) foi digerido com NruI e EcoRI (New England Biolabs), purificado usando uma coluna de Purificação PCR Qiaquick (Qiagen), como descrito pelo fabricante e ligado em NruI/EcoRI digerido e pJRS315 purificado em gel, resultando em plasmídeo PACTEI (veja Figura 7). O produto PCR de cadeia leve "11E10" (aproximadamente 350 bp) foi clonado no vector de clonagem T/A como pelas instruções do fabricante. O clone resultante, pACELC, foi digerido com EcoRV e BstBl (New England Biolabs) e o fragmento de cadeia leve foi purificado em gel. Este fragmento foi ligado, então, no EcoRV/BstBI digerido e pACE1 purificado em gel, resultando em plasmídeo pACE4 (veja Figura 7). A sequência das

regiões variáveis de cadeia pesada e leve foi verificada antes da transfecção de célula de mamífero.

EXEMPLO 5. Construção do vector de expressão pJRS315.

O plasmídeo pJRS315 é o plasmídeo de expressão no qual as regiões variáveis do anticorpo 11E10 foram clonadas. Este plasmídeo é um derivado de um vector de expressão básico, plasmídeo pSUN15, que não contém nenhuma informação de codificação da região variável do anticorpo, pJRS315 foi criado usando ligações de fragmento de DNA e etapas de mutagenese dirigida ao sítio. O resultado foi um vector que expressa ambas as cadeias de anticorpo com transcrição guiada por promotor CMV (veja Figura 17). A resistência a neomicina serve como o marcador relacionável dominante para transfecção de células de mamífero. Além disso, ela destina-se a permitir clonagem conveniente de qualquer região variável de cadeia leve como um fragmento EcoRV/BstBI, qualquer região variável de cadeia pesada como um fragmento NruI/EcoRI e qualquer domínio constante de cadeia pesada como um fragmento EcoRI/NotI. Estes sítios de restrição foram escolhidos porque eles raramente (se já) acontecem em regiões variáveis em humanos e ratos. Há um fragmento região J/intrão kappa de rato fundido a um exão kappa humano de forma que depois da emenda pós transcrecional uma cadeia leve kappa quimérica rato/humano é produzida.

A espinha dorsal do vector era o plasmídeo pCDNA3

(Invitrogen). Este plasmídeo foi cortado com HindIII/XhoI e um fragmento de DNA "poliligante de cadeia leve" foi inserido para criar o "vector de cadeia leve" de partida. Este ligante estava contido nos sítios de restrição HindIII, KpnI, ClaI, PmII, EcoRV, XmaI, BamHI e Xhol para facilitar os passos de clonagem subsequentes para criar o plasmídeo pCDNA3.LCPL. Um fragmento de DNA SmaI/BcII contendo um líder de cadeia leve, fragmento genómico de cadeia leve kappa CKMB e 3'UTR foram clonados nos sítios EcoRV/BamHI de pCDNA3.LCPL. O intrão kappa de rato, exão e 3'UTR neste fragmento foram derivados de LCPXK2 recebido de Dr. Richard Near (Near, R. I. et al., *Mol. Immunol.* 27: 901-909, (1990)). Mutagénese foi executada, então, para eliminar um sítio NruI (209), MluI (229) e BstBI (2962) e introduzir um NheI (1229) e um sítio BamHI (1214) para criar pcDNA3mut.LCPL.LCVK (veja Figura 12).

Um segundo "vector de cadeia pesada" foi construído do plasmídeo pcDNA3mut.LCPL.LCVK substituindo a região de expressão da cadeia leve (HindIII/Xhol) por um "poliligante de cadeia pesada" consistindo em sítios de restrição HpaI, BspEI, EcoRV, KpnI e XhoI. Este plasmídeo foi digerido com EcoRV e KpnI. Um fragmento de DNA digerido com SmaI/KpnI contendo um líder de cadeia pesada e um fragmento genómico de cadeia pesada de rato IgG2b anti-CKMB foi ligado, então, no plasmídeo digerido EcoRV/KpnI. Um fragmento de oligonucleotídeo KpnI/SalI contendo um 3'UTR e um NotI a montante do sítio SalI foi subsequentemente clonado no plasmídeo digerido KpnI/Xhol (knock out

do sítio Xhol) para criar o plasmídeo pCDNA3mut.HCPL.HCV2b (veja Figura 13).

Deste ponto, foram criados dois vectores que não tinham nenhuma das sequências de DNA de domínio variável ou constante anti-CKMB. Isto foi feito cortando o plasmídeo pcDNA3mut.LCPL.LCVK com EcoRV/Xhol e inserindo um fragmento de oligonucleotídeo ligante contendo sítios EcoRV, BstBI e Xhol para criar pSLJN9 (veja Figura 14). De um modo semelhante, o fragmento anti-CKMB em pCDNA3mut.HCPL.HCV2b (NruIJNotI) foi substituído por um fragmento de oligonucleotídeo ligante contendo sítios NruI, EcoRI e NotI para criar PSUN 10 (veja Figura 15). Um domínio constante de cadeia leve kappa foi, então, clonado em pSUN9 como um fragmento BstBI/Xhol e um domínio constante IgG1 humano foi clonado em pSUN10 como um fragmento EcoRI/NotI.

Um fragmento BgIII/NheI do vector de cadeia pesada humano foi, então, clonado no corte de vector de cadeia leve humano com BamHI/NheI para criar pSUN15 (veja Figura 16).

O plasmídeo pJRS315 foi, então, construído usando pSUN15 por meio do processo a seguir. Uma região variável de cadeia pesada de outra linhagem de célula de hibridoma não relacionada (aproximadamente 400 bp) foi digerida com NruI e EcoRI New England Biolabs), purificada usando uma coluna de Purificação por PCR Qiaquick

(Qiagen), como descrito pelo fabricante, e ligada em NruI/EcoRI digerido e pSUN15 purificado em gel, resultando em plasmídeo pJRS311 (veja Figura 16).

Neste momento, um fragmento de DNA BstBI/NotI (New England Biolabs) contendo um fragmento intrão J-kappa kappa de rato fundido a um fragmento exão kappa humano foi digerido e purificado com gel do vector tKMC180C2. Este fragmento foi ligado na espinha dorsal de pJRS311 digerido com BstBI/NotI e purificado por gel resultando no plasmídeo pJRS315 (veja Figura 17).

EXEMPLO 6. Produção estável de anticorpo "11E10" rato/humano quimérico recombinante.

A. Transfecção de células NSO

O plasmídeo pACE4 foi transfetado em células NSO usando electroporação. O plasmídeo foi linearizado com uma digestão de enzima de restrição PvuI. 40 µg DNA de plasmídeo digerido foram misturadas com 7×10^6 células em um volume total de 400 µL e incubadas a temperatura ambiente com agitação suave durante um minuto. 10 µL de DMSO (Sigma) foram adicionados a uma concentração final de 1,25%. A mistura de células/DNA/DMSO foi transferida a uma cuveta de 0,4 centímetros fria e submetida a um pulso de 250 Volts, 960µF. As células foram transferidas para um poço de uma placa de seis poços contendo 5 ml de meio não selectivo suplementado com DMSO (concentração final de

1,25%). Depois de 24 horas a 37°C e 10% CO₂ as células foram colocadas em placas de microtitulação de 96 poços. Na medida em que as colónias apareceram, os sobrenadantes foram analisados para a produção de anticorpo "humanizado" e para a capacidade do anticorpo expressado ligar-se à toxina Stx2.

B. Ensaio para Produção de Anticorpo

A produção de anticorpo e ensaios de actividade para os transfectantes estáveis foram executadas em tiras de 8 poços de placas de microtitulação de 96 poços (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) revestidas com uma diluição 1:500 de anticorpo anti-IgG cabra anti-humano F(ab')₂ (Southern Biotechnology) usando um tampão de revestimento de bicarbonato, pH 8,5. As placas foram cobertas com filme sensível à pressão (Falcon, Becton Dickinson) e incubadas durante a noite a 4°C. As placas foram, então, lavadas uma vez com solução de lavagem (imidazola/NaCl/0,4% Tween-20). 100 µL do sobrenadante de cultura foram, então, aplicados e incubados durante 30 minutos em um girador de placa a temperatura ambiente. As placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem (imidazola/NaCl/0,4% Tween-20). Um conjugado cabra anti-humano kappa-HRP (Southern Biotechnology) foi diluído a 1:800 no diluente amostra/conjugado e 100 µL foram acrescentados às amostras, então, incubados em um girador de placa por 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas como acima

e, então, incubadas com 100 μ L por poço de substrato de revelação ABTS (Kirkgaard & Perry Laboratories) e o valor da absorvência a 405 nm foi determinado usando um Leitor ELISA de placa de microtitulação autómato (Ceres UV900H1, BioTek Instruments, Winooski, Vermont). Este ensaio (ver Figura 10) demonstra que a transfecção de células com este constructo de plasmídeo resulta em células que produzem uma molécula contendo tanto IgG humano quanto domínios kappa.

Os sobrenadantes foram, então, analisados para a capacidade dos anticorpos expressados ligarem-se à toxina EHEC Stx2. O ensaio de actividade foi executado, como acima, usando placas cobertas a 1 μ g/ml com toxina Stx2 (obtida como no Exemplo 7 do Dr. O'Brien lab) em um tampão de revestimento de bicarbonato, pH 8,5. Este ensaio demonstra que a transfecção de células com este constructo de plasmídeo pode resultar na produção de uma versão quimérica humanizada do anticorpo monoclonal de rato 11E10 que efectivamente liga-se a toxina Shiga tipo 2 (Figura 11).

Juntos, estes ensaios demonstram que a transfecção de células com este constructo de plasmídeo pode resultar na produção de uma linhagem celular estável que produz uma versão quimérica humanizada do anticorpo de hibridoma de rato 11E10.

EXEMPLO 7. Verificação da Eficácia Biológica e Imunológica de Anticorpos Humanizados para toxina Shiga.

A. Ensaio de Citotoxicidade de Célula Vero

A eficácia dos anticorpos humanizados para toxina Shiga obtida como detalhado nos Exemplos 1 a 6 foi determinada analisando a capacidade deles para proteger células Vero da toxina. Ensaios de citotoxicidade foram conduzidos essencialmente como descrito por Gentry e Dalrymple, *J. Clin. Microbiol.*, 12: 361-366 (1980). Sucintamente, a toxina foi obtida de culturas de estirpes de *E. coli* K-12 que continham ou plasmídeo pLPSH3 (codifica Stx; *J. Infect. Disease* 164: 344-352 (1991)) ou pMJ 100 (codifica Stx2; *Inf and Immunity*, 57: 3743-3750 (1989)). As bactérias foram rompidas por meio de lise sônica e clarificadas por meio de centrifugação. Os extractos foram diluídos em série em meio de cultura de tecido (meio Eagle modificado com Dulbecco contendo 10% soro de bezerro fetal, glutamina 0,8 mM, 500 U de penicilina G por ml e 500 mg. de estreptomicina por ml.). Cem microlitros de diluições de 10 vezes dos lisados foram adicionados aos poços da placa de microtitulação contendo aproximadamente 10^4 células Vero em 100 μ l de meio. As células de cultura de tecido foram incubadas a 37°C em 5% CO₂ durante 48 horas e, então, fixadas e manchadas com violeta cristal. A intensidade de cor das células fixadas e manchadas foi medida com um leitor Titertek a 620 nm. A incubação sem anticorpo provê uma curva de toxicidade padrão a Stx.

B. Ensaio de Neutralização Anti-soros

Anticorpos de rato humanizados obtidos de acordo com os métodos descritos nos Exemplos 1 a 6 foram testados para neutralização de toxina. A neutralização de actividade de citotóxica foi descrita em mais detalhes em Schmitt et al., *Infect. and Immun.*, 59: 1065-1073 (1991). Sucintamente, lisados foram incubados com diluições em série dos anticorpos de rato humanizados a 37°C durante 2 horas. Cem microlitros das amostras foram, então, adicionados às células Vero como descrito acima.

TABELA 1: Ensaio de Neutralização de Célula Vero

Anticorpo	ng necessário para Neutralizar. 1 CD ₅₀ *
Rato 13C4	25
13C4 Humanizado	26
Rato 11E10	2,7
11E10 Humanizado	82,8

**(1 CD₅₀ = 1 pg de toxina pura)*

EXEMPLO 8. Imunização Passiva com Anticorpos Humanizados**A. Protecção contra injeção com toxina Stx1 crua.**

No dia zero, grupos de cinco ratos CD-1 foram

injectados intraperitonealmente (0,1 ml) com anticorpo H13C4 (α -Stx1B humanizado), 13C4 (α -Stx1B de rato), H11E10 (α -Stx2A humanizado) ou salina tamponada com fosfato (PBS). Estas injecções foram repetidas no dia 1. Os ratos foram, então, desafiados por meio de injecção intravenosa com toxina Stx1 crua (obtida como descrito no Exemplo 7) a doses de 1.7×10^5 ou 1.7×10^6 CD₅₀. Estas doses de toxina foram escolhidas seguindo experimentos preliminares com quantidades variáveis de toxina. Os ratos foram monitorizados durante 21 dias.

Os resultados (Tabela 2) mostram claramente que os anticorpos injectados protegem os ratos contra pelo menos 10 vezes a dose de toxina letal normal. Como um controlo negativo, os anticorpos para Stx2 não protegeram contra o desafio de toxina Stx1, indicando que a protecção foi específica ao par toxina/anticorpo, e não foi um artefacto do processo de preparação de anticorpo.

TABELA 2: Ratos CD-1 Injectados Intravenosamente com Stx1 Crua

Anticorpo (dose/rato)	#LD ₅₀ protegido contra	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ab para proteger a partir de 1LD ₅₀
13C4 Murino (1,4 μg)	10	6,1
13C4 Humanizado (4,1 μg)	20	8,9
11E10 Humanizado (232 μg)	0	Nenhuma protecção

* (1 LD₅₀ = 30 ng de Stx1 crua)

B. Protecção contra infecção oral com estirpes EHEC produtoras de Stx2.

Duas estirpes diferentes de ratos e bactérias foram usadas nestes estudos para testar a eficácia contra Stx2 e variante de Stx2. Ratos DBA/2J foram desafiados com estirpe EHEC 86-24 (0157: H7, Stx2⁺) e ratos CD-1 foram desafiados com estirpe B2F1 (091: H21, variante + Stx2). Embora a estirpe de *E. coli* B2F1 normalmente seja fatal a ambas as estirpes de ratos, a estirpe *E. coli* 86-24 é fatal a ratos DBA/2J, enquanto os ratos CD-1 sobreviverão a infecção 86-24.

No dia zero, o anticorpo H11E10 (α -Stx2A humanizado) ou 11E10 (α -Stx2A de rato) foi injectado intraperitonealmente (0.1 ml) em grupos de quatro ou cinco ratos. Grupos de controlo incluíam ratos que tinham recebido anticorpo 13C4 (α -Stx1B de rato), ratos que tinham recebido fluido ascite 11E10 (α -Stx2A de rato) ou ratos que tinham recebido PBS em vez de anticorpo. Os ratos receberam estreptomicina (5 g/L) na água potável deles para diminuir a flora intestinal normal e a comida deles foi retirada. Derivados resistentes a estreptomicina das estirpes 86-24 (0157: H7, Stx2⁺) e B2F1 (091:H21, variante⁺ de Stx2) foram crescidos durante a noite em caldo L.

O dia a seguir (dia 1) os ratos receberam uma segunda injecção de anticorpo de teste, anticorpo de controlo ou PBS. Os ratos foram imediatamente alimentados

com 10^{10} CFU de 86-24 que haviam sido peletizados e ressuspensos em 20% sacarose ou 10^3 CFU de B2F1 que haviam sido diluídos em série em 20% sacarose. A comida retornou à gaiola e os ratos foram monitorizados durante 21 dias. (CFU=Unidades Fomadoras de Colónia)

Como mostrado na Tabela 3, a imunização dos ratos ou com anticorpos anti-Stx2 humanizados ou murinos resultou em protecção completa de uma dose oral letal de EHEC. A imunização com anticorpo 13C4 de rato, preparado da mesma maneira, mas imuno-reactivo com a toxina Stx I em vez da toxina Stx2, não protegeu os ratos do desafio com 86-24, um resultado que indica a imunoespecificidade da resposta.

TABELA 3: Ratos DBA/2J Alimentados com 10^{10} CFU 0157 (Stx2)

Anticorpo (dose/rato)	Sobreviventes
13C4 Murino (1,4 µg)	0/5
11E10 Murino (1,0 µg)	5/5
11E10 Humanizado (1,0 µg)	5/5

Resultados semelhantes são ilustrados na Tabela 4, onde os ratos CD-1 mais resistentes foram alimentados com estirpe de *E. coli* B2F1 que produz toxina variante de Stx2. Sem tratamento com anticorpo, a mortalidade foi total, mas ambos os anticorpos de rato e humanizado protegeram contra a variante de Stx2 de uma maneira a depender da dose.

**TABELA 4: Ratos CD-1 alimentados com 103 CFU 091: H21
(variante de Stx2)**

Anticorpo (dose/rato)	Sobreviventes
PBS	0/5
11E10 Murino (8,7 µg)	1/4*
11E10 Murino (6,45 µg)	5/5
11E10 Humanizado (23,2 µg)	0/5
11E10 Humanizado (232 µg)	5/5

Dose protectora entre 10,1 e 1,0 mg/kg

** Tempo médio de atraso para morte antes de 3,4 dias*

EXEMPLO 9. Tratamento de doença causada por bactérias que produzem toxina Shiga.

Os requerentes ainda descrevem uma variedade de métodos de tratar, melhorar ou prevenir as doenças e os efeitos associados com a exposição a toxina Shiga. Respostas clínicas positivas em humanos foram obtidas com anticorpos monoclonais e um técnico da especialidade saberia como empregar os anticorpos anti-Stx humanizados em humanos. (Veja Fagerberg et al., *Cancer Research*, 55: 1824-27 (1995); *Eur. J. Cancer*, 2: 261-267 (1995)). A dosagem precisa de anticorpo de toxina anti-Shiga humanizado administrada a um paciente para tratamento destas doenças variará conforme os factores apreciados pelo clínico típico. Estes factores incluem (mas não se limitam a) tamanho, idade, saúde global, a extensão de infecção e

outros medicamentos que são administrados ao dito paciente. O desenvolvimento de um regime de tratamento preciso requererá optimização por procedimentos médicos rotineiros conhecidos dos técnicos da especialidade médica. Exemplos de grupos de paciente potenciais incluiriam (mas não se limitariam a) crianças jovens com diarreia sanguinolenta, mas nenhuma célula branca na evacuação, pacientes com indicações de HUS, pacientes com testes de amostra de evacuação positivos para toxina Shiga, irmãos ou coortes de tratamento diário em contacto com um caso (como uma medida preventiva passiva) e qualquer paciente com diarreia (não necessariamente sangrenta) que entrou em contacto com um caso identificado. Uma dosagem típica de cerca de 5 mg/kg peso corporal de 13C4 humanizado combinado com aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal de 11E10 humanizado seria contemplada. Esta formulação combinada poderia ser administrada duas vezes ao paciente para assegurar efectividade. A inclusão de ambos os tipos de anticorpos humanizados proporciona garantia que o paciente será protegido contra todos os tipos de toxina Shiga revelados neste.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

«110» HENRY JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE

«130» ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS QUE PROTEGEM CONTRA DOENÇA INDUZIDA PELA TOXINA SHIGA.

«130» 04995.0032-00304

«140»

«141»

«160» 44

«170» Paxantin Ver. 2.0

«210» 1

«211» 45

«212» DNA

«213» Sequência Artificial

«220»

«223» Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

«400» 1

att tca ggc cca gcc ggc cat ggc cga rgt rna gct ksa kga gwc 48

«210» 2

«211» 45

«212» DNA

«213» Sequência Artificial

«220»

«223» Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

«400» 2

atttcaggcc cagccggccca tggccgatgt yccaccckar carys

48

<210> 3
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 3 45
atcccaaggcc cagccggcca tggcccaaggc gaagctkts gartc

<210> 4
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 4 45
accccaaggcc cagccggcca tggcccaaggc rmsgctksak gagwc

<210> 5
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 5 45
atcccaaggcc cagccggcca tggcccaaggc bcarctkmxr sartc

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 6 26
gaartavccc tngacccaggc

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotideo Sintético 35
 ggaggcggggcg gttcttgacat tggggatggwcm carrc

 <210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotideo Sintético 35
 ggaggcggggcg gttcttgatrt tkygatgacb carrc

 <210> 9
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotideo Sintético 35
 ggaggcggggcg gttcttgayat ymagatgacm dagwc

 <210> 10
 <211> 35
 <212> RNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotideo Sintético 35
 ggaggcggggcg gttcttsaaaat tgwktccsacy cagtc

<210> 11
<211> 40
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 11
ttccataggcg gcccacatcg tagtcgttt cagttccarc 40

<210> 12
<211> 40
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 12
ttccataggcg gcccacatcg tagtcgttt katytccarc 40

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 13
gcacccctcag acgttaactg ctc 23

<210> 14
<211> 49
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 14
cttgtatcgcg acagttacatcg gtgtccacatc ccagggtgcag ctgtcaggag 49

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 16

ggtagggaaat tctgaggaga ctgtgagagt ggtggcc

36

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 16

ggttttgtata tctgtatgttc ccgttctcac aaatttt

36

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 17

gacatatttcg aaaaatgttac ttacgtttca gttcccaact gg

42

<210> 18

<211> 366

<212> DNA

<213> Shigella dysenteriae

<400> 18

 caggtgcaggc tgcaggaggc tggggctgag ctgggtgggt ctggggccctc agtggaggatc 60
 tcctgcaggc ttctctggctt cacatttacc agtttacata tgcactgggtt aaaaacggaca 120
 ctggacagg gccttggaaatg gatggatat attttatcccg gaaatgggtgg tactsactac 180
 attcagaat ttaaggggca a ggcatttttg actgcagaca catccctccag cacagccac 240
 atgcagatca gcaatgcgttgc acatgttggac tctgggggtt attttctgtac aagaatgtcc 300
 tctcaactaca gtaatgttgcaccc ctatctttgtac tactggggcc agggcaccac tctcacatgtc 360
 tctca

366

<210> 19

<211> 122

<212> PRT

<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 19

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

Ser Val Arg Met Ser Cys Asp Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ile Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Pro Ser His Tyr Ser Ser Asp Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 20
 gatatccgtga cgtccccagcc tcaacaaatcc atgtccacat cagtcggaga cagggtcaggc 60
 attcacctgtta aggcccaagccca ggatgtgggtt actgtcggttg cctggatccca gcagaatccca 120
 ggacaatctc cttaaatttctt gatttactgg gcataccacac ggcacacactgg agtccctgtat 180
 cgcttcacacag gcagtggtttc tgggacagat ttcacccca cattaccaaa tggcgtgtat 240
 gaagacttgg cagattatcc ctgtcagcaa tatacgagtt atccctctcac gttccgtgtat 300
 gggaccagtc tggagctgas acgc 324

<210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 21
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln Ser Pro Lys Phe Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Ser Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 22

atttcaggcc cagccggcca tggccgargt xmagctkssak gagwc

45

<210> 23

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 23

atttcaggcc cagccggcca tggccgargt ycacatkcar caryc

45

<210> 24

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 24

atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt gaagctksts garts

45

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 25

atttcaggcc cagccggcca tggccgavgt gmwgctkgtg gagwc

45

<210> 26
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 26
atcccaggcc cagccggccca tggcccaagggt bccarctkmar sartc 45

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 27
gaaatcavccca ttgaccaggc 39

<210> 28
<211> 35
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 28
gttgtccacccg ccacccggcg agacdtgtgas tgarg 35

<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 29
gttgtccacccg ccacccggcg agacdtgtgas mgtrg 35

<210> 30
<211> 35
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 30
gttgcaccccg ccacactggmry agacdggtgaa cagrcg 35
<210> 31
<211> 35
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 31
ggaggccggcg gttactgacat tttgtgttgwcm cattc 35
<210> 32
<211> 35
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 32
ggaggccggcg gttccggatrt tkygtatgach cattc 35
<210> 33
<211> 35
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 33
ggaggccggcg gtttctgatayat ymagatgacm cagwcc 35

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 34

ggagggcgccg gtttctttaat tgwkcttac y cagtc

35

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 35

ttccataggcg gccgcactag tagcmcgttt cagytccarc

40

<210> 36

<211> 40

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 36

cccacaggcg gccgcactag tagcmcgttt katytccarc

46

<210> 37

<211> 52

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 37

atatactcgc gacagctaca ggtgtccact ccgaagttcc aactggcaccag cc

52

<210> 38
<211> 34
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 38
attaaatgtat tctgcggaga cggtgagagt ggtc 34

<210> 39
<211> 39
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 39
ttaaaatgtata cccgtgtgttc acaacccccc 29

<210> 40
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Oligonucleotídeo Sintético

<400> 40
caatcggttcg aaaaatgtgtac ttacgtttca gttcccaagttt ggtcc 45

<210> 41
<211> 339
<212> DNA
<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 41
gacatcggttcg tggccaccaacc tccatccccc ctatgtgtgt cagttggaga gaaaggtaact 60
atgagcttgca agtcttagtca gagccctttca tatagtagaa atcaaaaagaa ctacccggcc 120
tggtaccaggc agaaaaccagg gcaatgtttccat aaatgtgttga ttatctgggc atctatccagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cccacaggc agtggatctg ggacagatct cacttcacc 240
 atcagcagtcg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagttat 300
 ccgtcacgt taggtgtctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 42
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 42
 Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Val Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Leu Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 Lys

<210> 43
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 43
 gaagtccaaac tgcacacagcc tggacatgag ctggagaaac ctggcgatcc agtgaaacta 60
 tccatgcasgg cttctggtta ctatttcaact gactacaaca tgaactgggt gaagcagaaac 120

aacggagaga gctttgagtg gatggaaaa attgtatccctt actatggtgg tccctagctac 180
 aaccagaagt tcaaggacaa ggcacatgg actgttagaca agctttccag cacagectac 240
 atgcagttca ayaagcttgac stctgaggac tctgcagtct attactgtac aagagggaga 300
 aatagggact ggtacttoga tgggtggggc gcagggacca cgctcaccgt ctccgca 357

<210> 44
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Shigella dysenteriae

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Pro Gln Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Lys Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Phe Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Gly Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala
 115

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição farmacêutica que compreende um primeiro anticorpo monoclonal humanizado que liga-se à proteína da toxina Shiga tipo 1 (Stx1) e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que une-se a proteína da toxina Shiga tipo 2 (Stx2), onde o primeiro anticorpo compreende uma região constante de imunoglobulina humana e compreende as regiões variáveis de cadeia leve e cadeia pesada da imunoglobulina, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 19 e 21 e onde o segundo anticorpo compreende uma região constante de imunoglobulina humana e compreende regiões variáveis de cadeia leve e cadeia pesada da imunoglobulina, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 42 e 44.

2. Uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro anticorpo monoclonal humanizado que liga-se a Stx1 e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que liga-se ao antigénio Stx2, onde a região variável do segundo anticorpo compreende a região variável do anticorpo murino 11E10 com Adesão ATCC No. CRL 1907 e a região variável do primeiro anticorpo compreende a região variável do anticorpo murino 13C4 com Adesão ATCC No. CKL 1794.

3. A composição farmacêutica da reivindicação 1 ou 2, onde o primeiro ou segundo anticorpo compreende

uma região constante humana seleccionado do grupo constituído de IgG, IgA e IgM.

4. A composição farmacêutica da reivindicação 3, onde a região constante humana do primeiro ou segundo anticorpo monoclonal é IgG.

5. A composição farmacêutica da reivindicação 3, onde a região constante humana do primeiro ou segundo anticorpo monoclonal é IgG-kappa.

6. A composição farmacêutica de qualquer das reivindicações 1 a 5, compreende ainda um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

7. O uso de uma composição compreendendo um primeiro anticorpo monoclonal humanizado que liga-se à proteína Stx1 e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que liga-se à proteína Stx2, onde o primeiro anticorpo compreende uma região constante de imunoglobulina humana e compreende regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve da imunoglobulina, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 19 e 21 e onde o segundo anticorpo compreende uma região constante de imunoglobulina humana e compreende regiões variáveis de cadeia leve e cadeia pesada da imunoglobulina, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 42 e 44 na manufactura de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma infecção, resultando em síndrome hemolítico-urémica causada

por *Escherichia coli* entero-hemorrágica ou outra toxina Shiga que produz bactérias.

8. O uso da composição que compreende um primeiro anticorpo monoclonal humanizado que liga-se ao Stx1 e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que liga-se a抗原 Stx2, onde a região variável do segundo anticorpo compreende a região variável do anticorpo murino 11E10 com Número de Acesso ATCC CRL 1907 e a região variável do primeiro anticorpo compreende a região variável do anticorpo murino 13C4 com Número de Acesso ATCC CKL 1794 e na manufatura de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma infecção, resultando em síndrome hemolítico-urémica causada por *Escherichia coli* entero-hemorrágica ou outra toxina Shiga que produz bactérias.

9. O uso de acordo com a revindicação 7 ou 8, onde o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante humana seleccionado do grupo constituído de IgG, IgA e IgM.

10. O uso de acordo com a reivindicação 9, onde a região constante humana do primeiro ou segundo anticorpo monoclonal é IgG, preferencialmente IgGI-kappa.

11. Uma composição compreendendo um primeiro anticorpo monoclonal humanizado que liga-se à proteína Stx1 e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que

liga-se à proteína Stx2, onde o primeiro anticorpo comprehende uma região constante de imunoglobulina humana e comprehende regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve da imunoglobulina, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 19 e 21 e onde o segundo anticorpo comprehende uma região constante de imunoglobulina humana e comprehende regiões variáveis de cadeia leve e cadeia pesada da imunoglobulina, tal como estabelecido em SEQ ID NOS: 42 e 44 para o tratamento ou prevenção de uma infecção, resultando em síndrome hemolítico-urémica causada por *Escherichia coli* entero-hemorrágica ou outra toxina Shiga que produz bactérias.

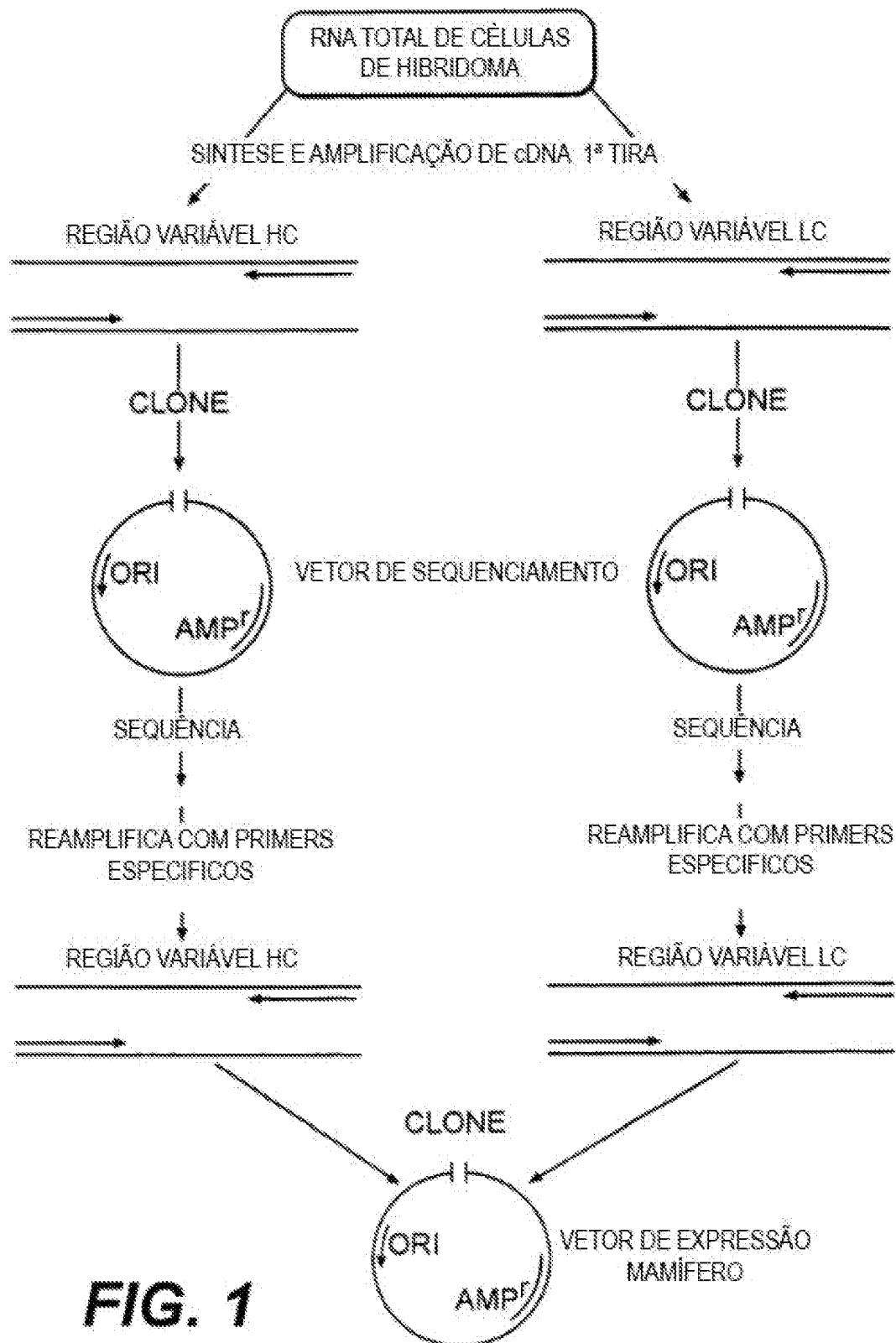
12. Uma composição compreendendo um primeiro anticorpo monoclonal humanizado que liga-se a Stx1 e um segundo anticorpo monoclonal humanizado que liga-se ao antigénio Stx2, onde a região variável do segundo anticorpo comprehende a região variável do anticorpo murino 11E10 com Número de Acesso ATCC CRL 1907 e a região variável do primeiro anticorpo comprehende a região variável do anticorpo murino 13C4 com Número de Acesso ATCC CKL 1794 para o tratamento ou prevenção de uma infecção, resultando em síndrome hemolítico-urémica causada por *Escherichia coli* entero-hemorrágica ou outra toxina Shiga que produz bactérias.

13. O uso de acordo com a reivindicação 11 ou 12, onde o primeiro ou segundo anticorpo comprehende uma

região constante humana seleccionado do grupo constituído de IgG, IgA e IgM.

14. A composição de acordo com a reivindicação 13, onde a região constante humana do primeiro ou segundo anticorpo monoclonal é IgG, preferencialmente IgG1-kappa.

Lisboa, 4 de Janeiro de 2010



PRIMEROS "FRONTAIS" DA CADEIA PESADA DE RATO

JSS1
 5' -ATTTCAGGGCCGCGCGCCATGCCGARGTRMAGCTSAKGAGNC-3' SEQ ID NO.1
 JSS2
 5' -ATTTCAGGGCCGCGCGCCATGCCGARGTYCARCTKCARCAYC-3' SEQ ID NO.2
 JSS3
 5' -ATTTCAGGGCCGCGCGCCATGCCGAGGTGAAGCTSTSGARTC-3' SEQ ID NO.3
 JSS4
 5' -ATTTCAGGGCCGCGCGCCATGCCGAGGTGAGCTGAGTCGAGNC-3' SEQ ID NO.4
 JSS5
 5' -ATTTCAGGGCCGCGCGCCATGCCGAGGTGAGCTGARCTGARSARTC-3' SEQ ID NO.5

PRIMEROS "TRASEIROS" DA CADEIA PESADA DE RATO

JS300
 5' -GAARTAVCCCTTGACCGCC-3' SEQ ID NO.6

PRIMEROS "FRONTAIS" LÍDERES DA CADEIA LEVE DE RATO

JSS009
 5' -GGAGCCCGCCGTTCTGACATTGTGTTGTCAGTCARTC-3' SEQ ID NO.7
 JSS010
 5' -GGAGCCCGCCGTTCTGATTTTGTGATGACBCARCC-3' SEQ ID NO.8
 JSS011
 5' -GGAGCCCGCCGTTCTGAYATTAAGTGAACAGNC-3' SEQ ID NO.9
 JSS012
 5' -GGAGCCCGCCGTTCTSAMATTGAGCTSACTCAGTC-3' SEQ ID NO.10

FIG. 2A

PRIMERS "TRASEIROS" DA CADEIA LEVE DE RATO

JS153

5' - TTCATAGCGGCCCACTAGTACGCGTTTCAGTCCARC-3'

SEQ ID NO.11

JS154

5' - TTCATAGCGGCCCACTAGTACGCGTTTCAGTCCARC-3'

SEQ ID NO.12

OKA57

5' - CCACCTCCAGATGTTAACCTTC-3'

SEQ ID NO.13

1304 PRIMERS ESPECIFICOS

OKA144

5' - CTTGATCGCGACAGCTACAGGTGTCCACTCCAGCTGCAGCTGCAGGAG-3' SEQ ID NO.14

OKA143

5' - GGTATGGATTCCTGCGGAGACTTGAGAGTGCTGCC-3'

SEQ ID NO.15

OKA145

5' - GGTCTGATATGTCGATGTCCAGTCTCAAAATTC-3'

SEQ ID NO.16

OKA146

5' - GACATTTGAAAGTGTACTTAGTTCAGCTCCAGCTGG-3'

SEQ ID NO.17

FIG. 2B

REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA 13CA ANTI-STX1

REGULAÇÃO VARIÁVEL DA CADÊMIA | FVE 13CA ANTI-STX1

GATATCGGAGTTCTGTCAGTCAATTCTTGACCTCTGCTGGAGCAGGGTCAGGATC SEQ ID NO.20
 D I V M S Q S H K P K S T S V G D R V S I SEQ ID NO.21
 ACTCTGAAACCCGCGCGCGCTGCGCTACTCTGTTGCCCTGCTATCAGCAGATCAGGACAA
 T C K A S O D V G T A V A W Y Q Q N P G Q
 TCTCTAAATTCTGATTCTGCGCATCCACACGCCACACTGGAGTCCCTGATCTTACAA
 S P K F L I Y H A S T E R I T G V P D R F T
 GCGACCTGATCTGGACAGTTCTCTCACCTTACCAATGTCGAGTCAGAGCTTGGCA
 C S C S G T D P T L T I T N V Q S E D L A
 GATTTCTCTGTCAGCATATACAGTTATCTCTCACCTTGGTCTGGACCTCTGAGC
 D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A S T S L E
 CTGAAACCT
 L K R

FIG. 3

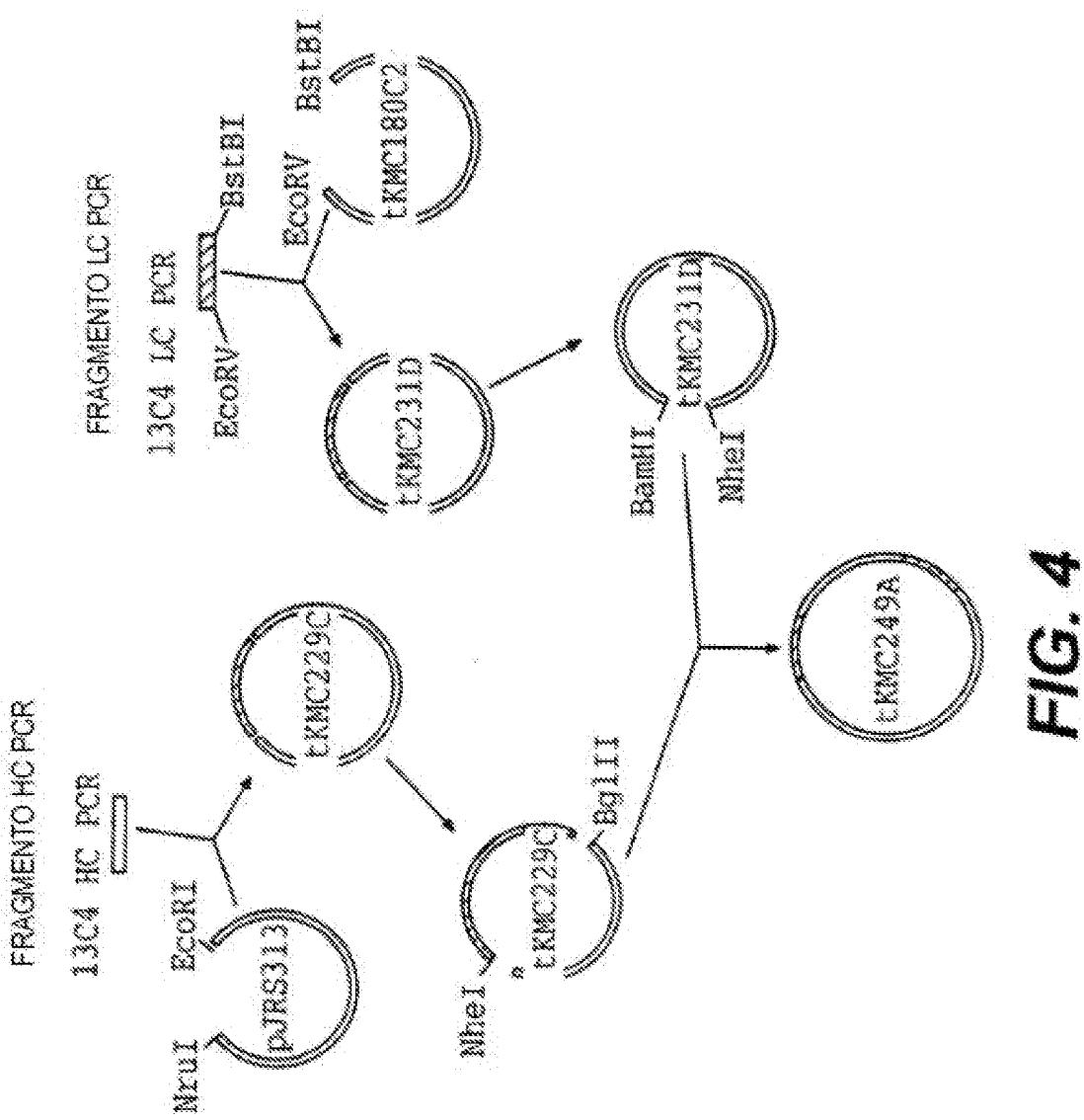


FIG. 4

PRIMERS "FRONTAIS" DA CADEIA PESADA DE RATO

JS001

5' - ATTTCAGGCCCCAGCCGCCATGCCCCGARGTRIAAGCTKSARGAGTC-3' SEQ ID NO.22

JS002

5' - ATTTCAGGCCCCAGCCGCCATGCCCCGARGTYCARCTKCARCACTC-3' SEQ ID NO.23

JS003

5' - ATTTCAGGCCCCAGCCGCCATGCCCCGAGCTGAACCTKSARTC-3' SEQ ID NO.24

JS004

5' - ATTTCAGGCCCCAGCCGCCATGCCCCGAGCTGAGCTKSARTC-3' SEQ ID NO.25

JA008

5' - ATTTCAGGCCCCAGCCGCCATGCCCCGAGCTKSARTKARSARTC-3' SEQ ID NO.26

PRIMERS "TRASEIROS" DA CADEIA PESADA DE RATO

JS300 5' - GAARTAVCCCTTGACCAGGC-3' SEQ ID NO.27

JS160 5' - GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTCAGTGARG-3' SEQ ID NO.28

JS161 5' - GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTCAGTGAGTC-3' SEQ ID NO.29

JS162 5' - GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTCAGSCAGRC-3' SEQ ID NO.30

PRIMERS "FRONTAIS" LÍDERES DA CADEIA LEVE DE RATO

JS009 5' - GGAGCCGGCGGTTCTGACATTCTGTTGKTCAGTC-3' SEQ ID NO.31

JS010 5' - GGAGCCGGCGGTTCTGATTTKYGATGACBCAERC-3' SEQ ID NO.32

JS011 5' - GGAGCCGGCGGTTCTGATTTKAGATGACAGTCAGTC-3' SEQ ID NO.33

JS012 5' - GGAGCCGGCGGTTCTGAAATTGAGCTSACTCAGTC-3' SEQ ID NO.34

FIG. 5A

PRIMERS "TRASEIROS" DA CADEIA LEVE DE RATO

JS153 5' - TTCATAGCGCGCGCACTAGTAGCAGCTTCACTGTC - 3' SEQ ID NO.35
JS154 5' - TTCATAGCGCGCGCACTAGTAGCAGCTTCACTGTC - 3' SEQ ID NO.36

PRIMERS ESPECÍFICOS "11E10"

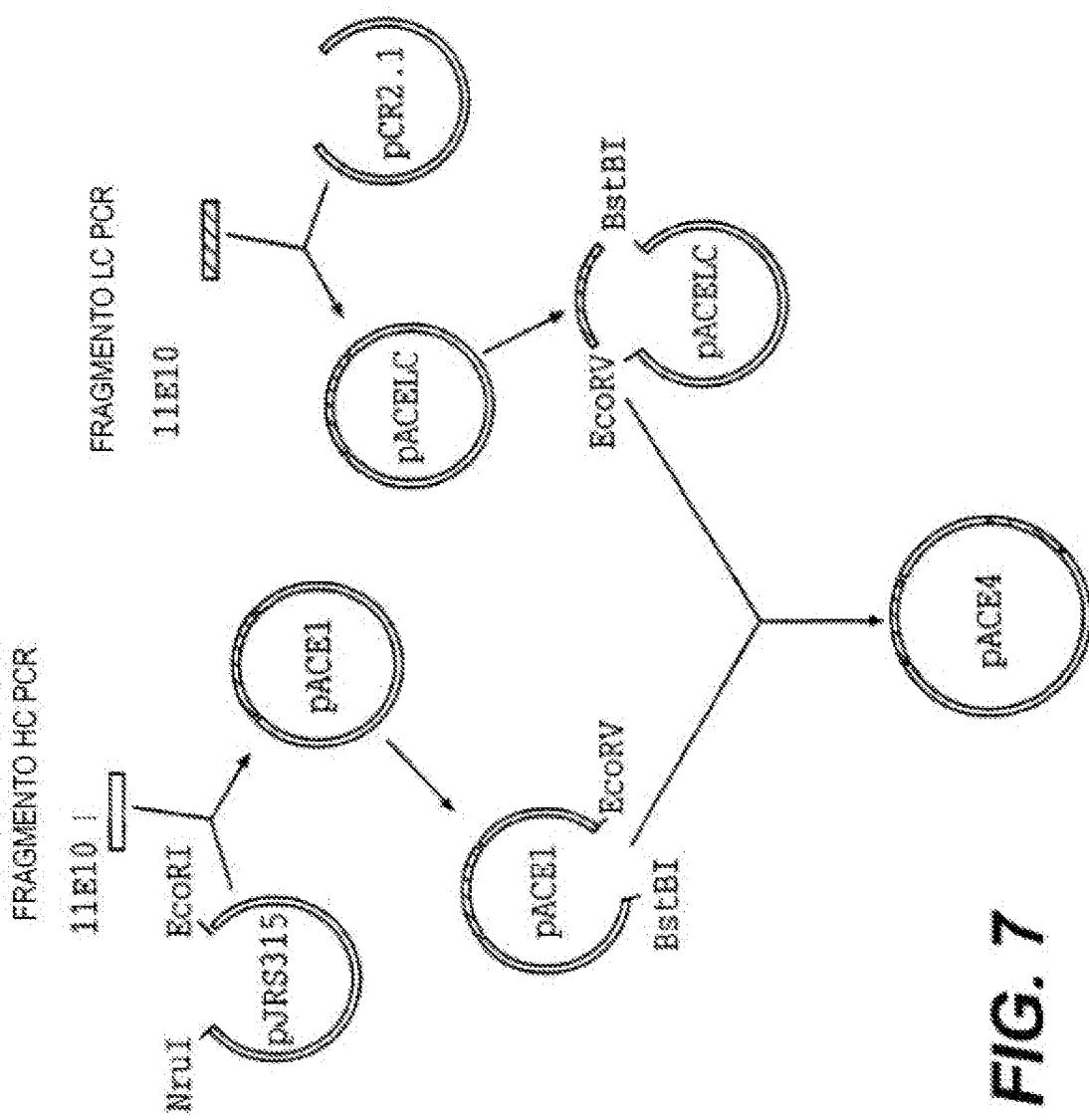
11E10RF	SEQ ID NO.37
5' - ATATAC <u>TCCGG</u> ACACTACAGGTGTCCACTCCGAAGTCCAACTGCCAACGCC - 3'	
11E10RB	
5' - ATTAA <u>TGAA</u> TTCTCGGGAGACGGTGAGAGTGTC - 3'	SEQ ID NO.38
11E10LF	
5' - TTAA <u>ATGAT</u> ATCCGTCTGACAAATCTCC - 3'	SEQ ID NO.39
11E10LB	
5' - TAAT <u>CGTT</u> CGAAAAGTGTACTTACGTTCACTTCCAGCTTGGTCC - 3'	SEQ ID NO.40

FIG. 5B

CADERNE DE 100		1/23/91 12:36 PM										SUBLINHADO DUPLO = GRS		SEGURO			
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
21	11010	GACCTTCA TGTGTTCTT TTTTCTTCTT CTTTTCTT CTTTTCTT CTTTTCTT CTTTTCTT															
27		U T V L S Q S P S S L V V S V C K V T K S C K S S Q															
		90	100	110	120	130	140	150	160								
21	11010	GACCTTCA TGTGTTCTT TTTTCTTCTT CTTTTCTT CTTTTCTT CTTTTCTT CTTTTCTT															
27		S L V S R H Q K W Y L A W Y Q Q X P G O S R V L															
		170	180	190	200	210	220	230	240								
21	11010	TTCCTTC AGCTTCCG AGCTTCCG AGCTTCCG AGCTTCCG AGCTTCCG AGCTTCCG															
27		I Y W A S T R E S G V P D R L T C S G T D S G T D P T L T															
		250	260	270	280	290	300	310	320								
21	11010	TTTCTTCTT TTTCTTCTT TTTCTTCTT TTTCTTCTT TTTCTTCTT TTTCTTCTT															
27		I S S V K A R D L K V Y Y C Q Q Y V S Y P L T P G A G															
		330	340	350	360	370	380	390	400								
21	11010	GACCTTCA TGTGTTCTT TTTTCTTCTT CTTTTCTT CTTTTCTT CTTTTCTT															
27		T K L E L X															

FIG. 6A

FIG. 6B

**FIG. 7**

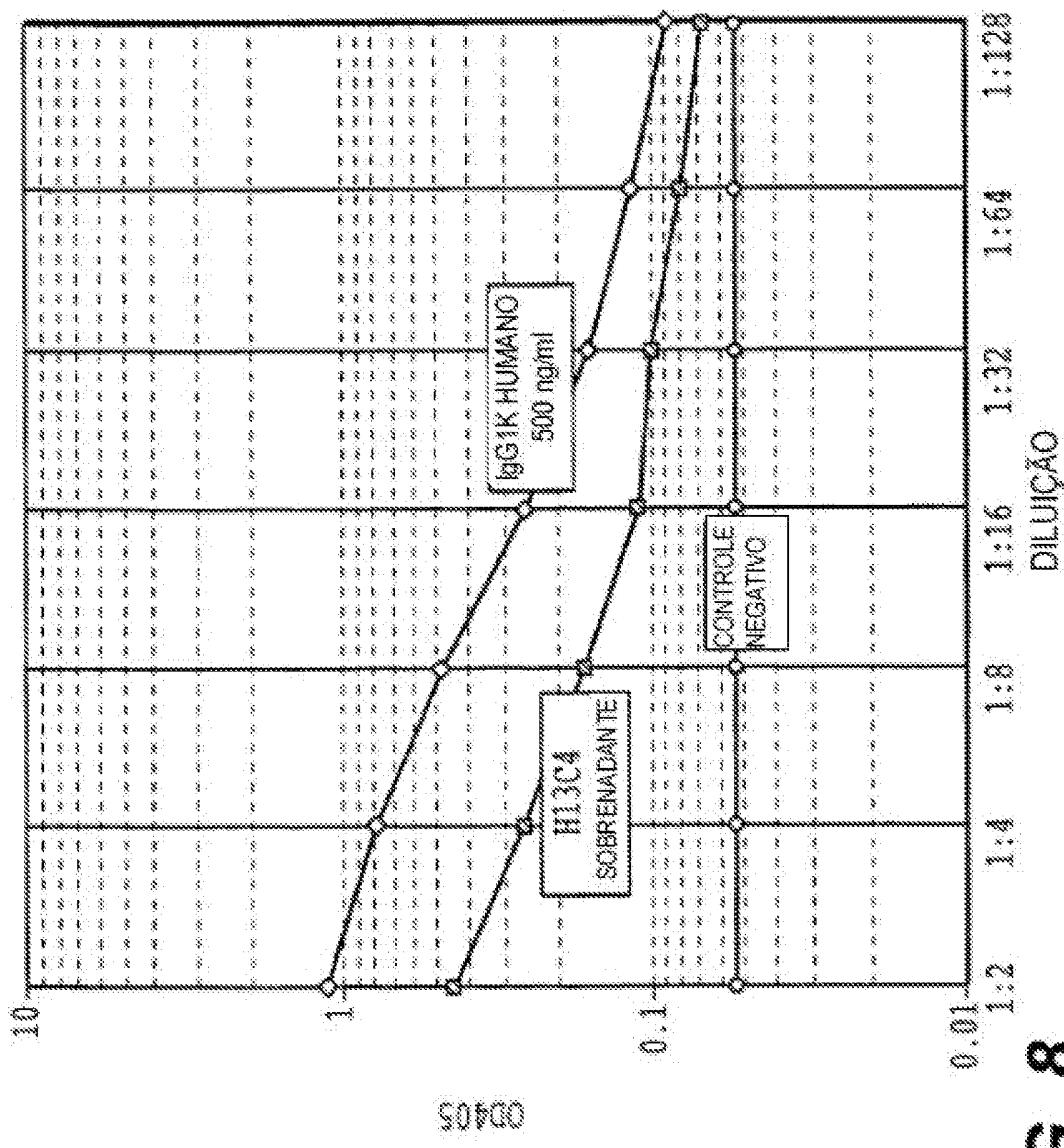


FIG. 8

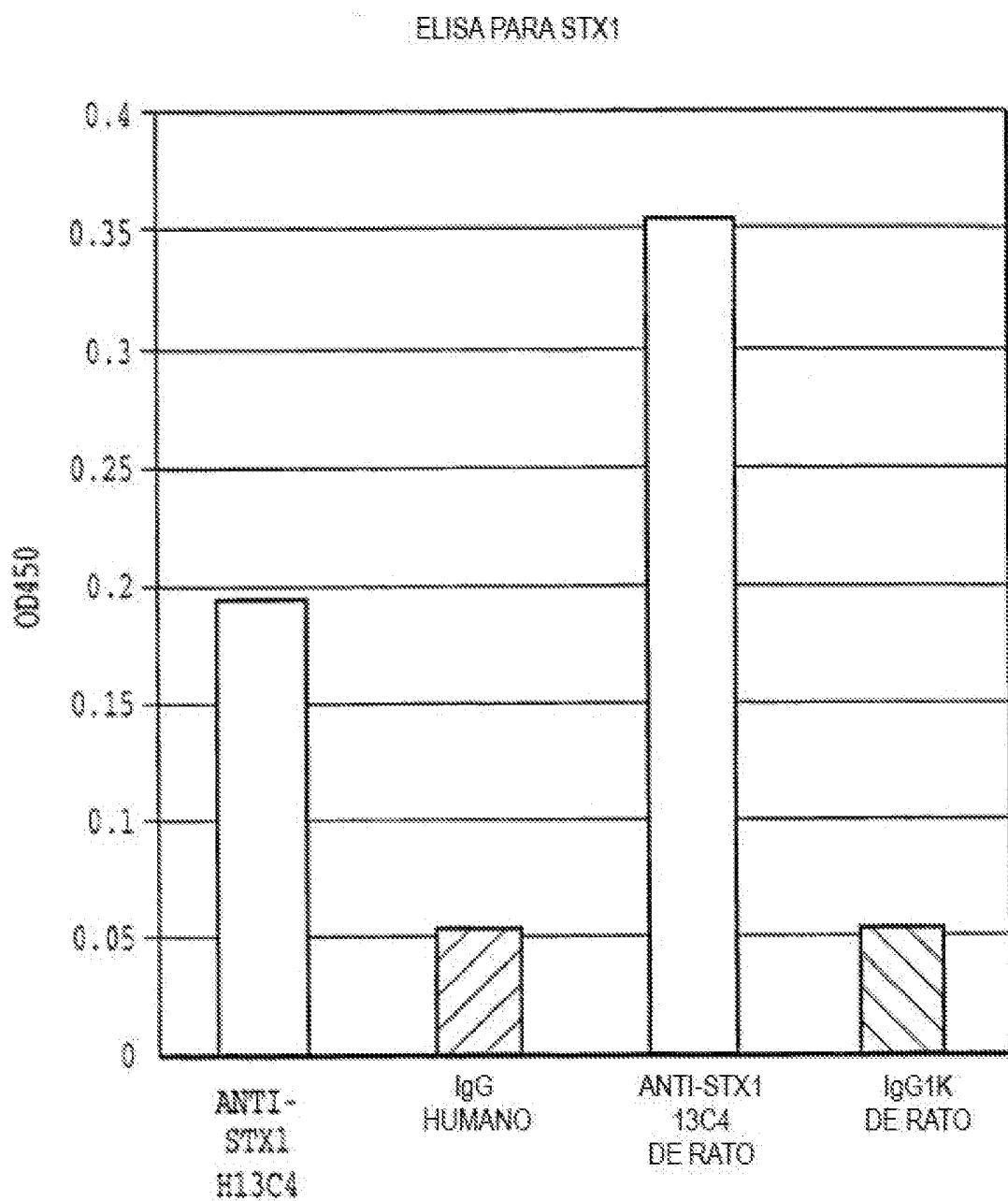


FIG. 9

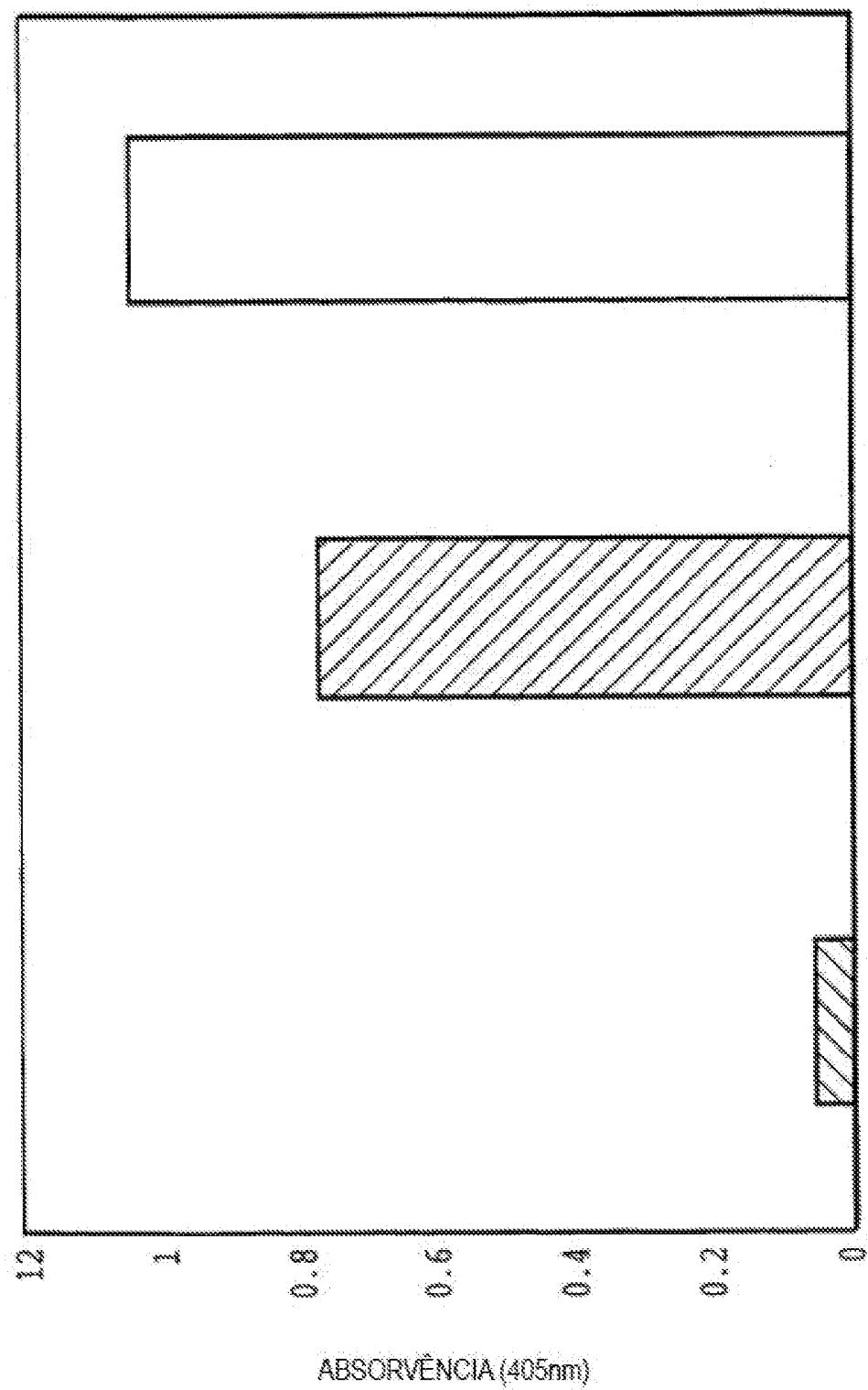


FIG. 10

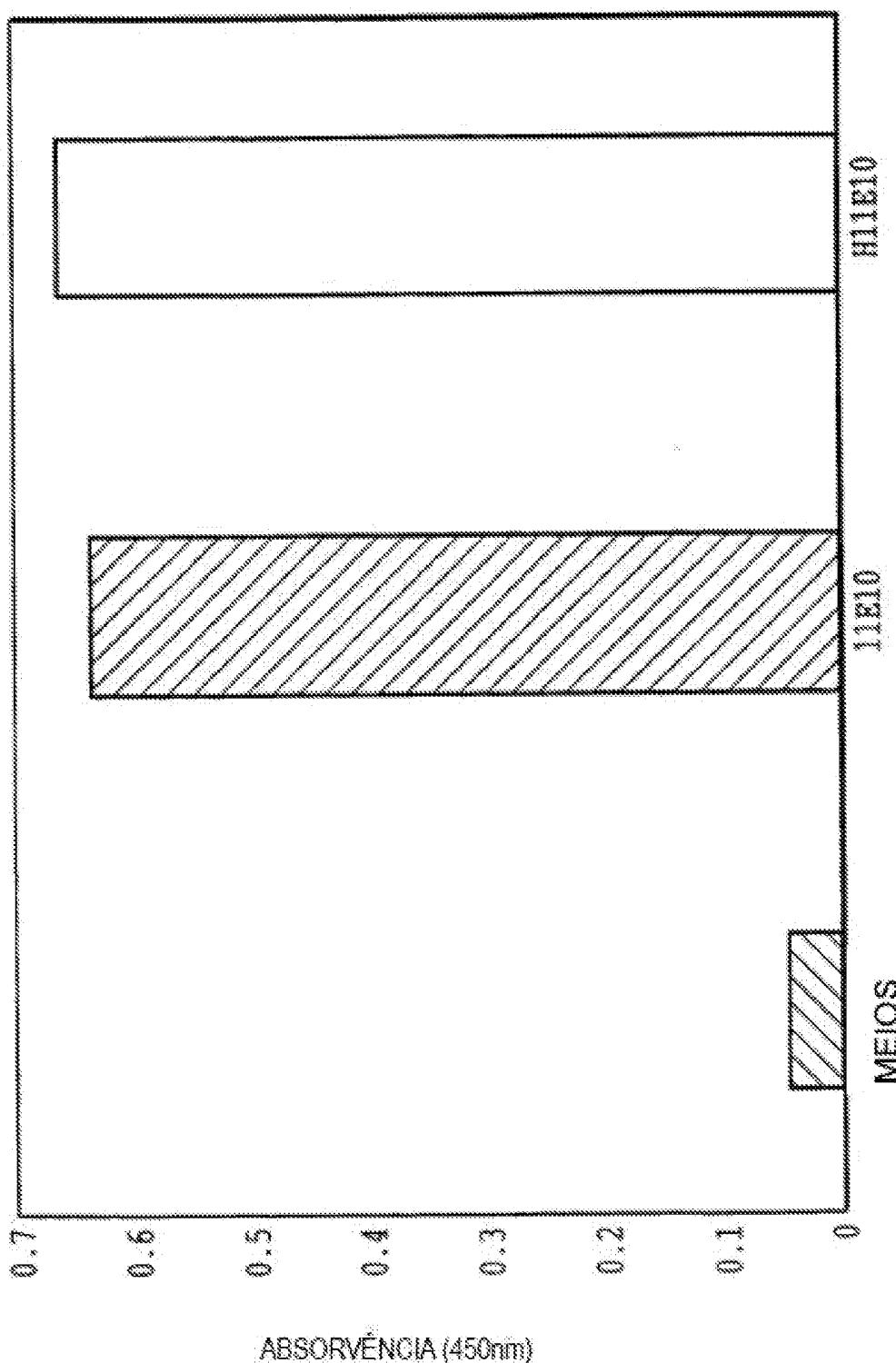
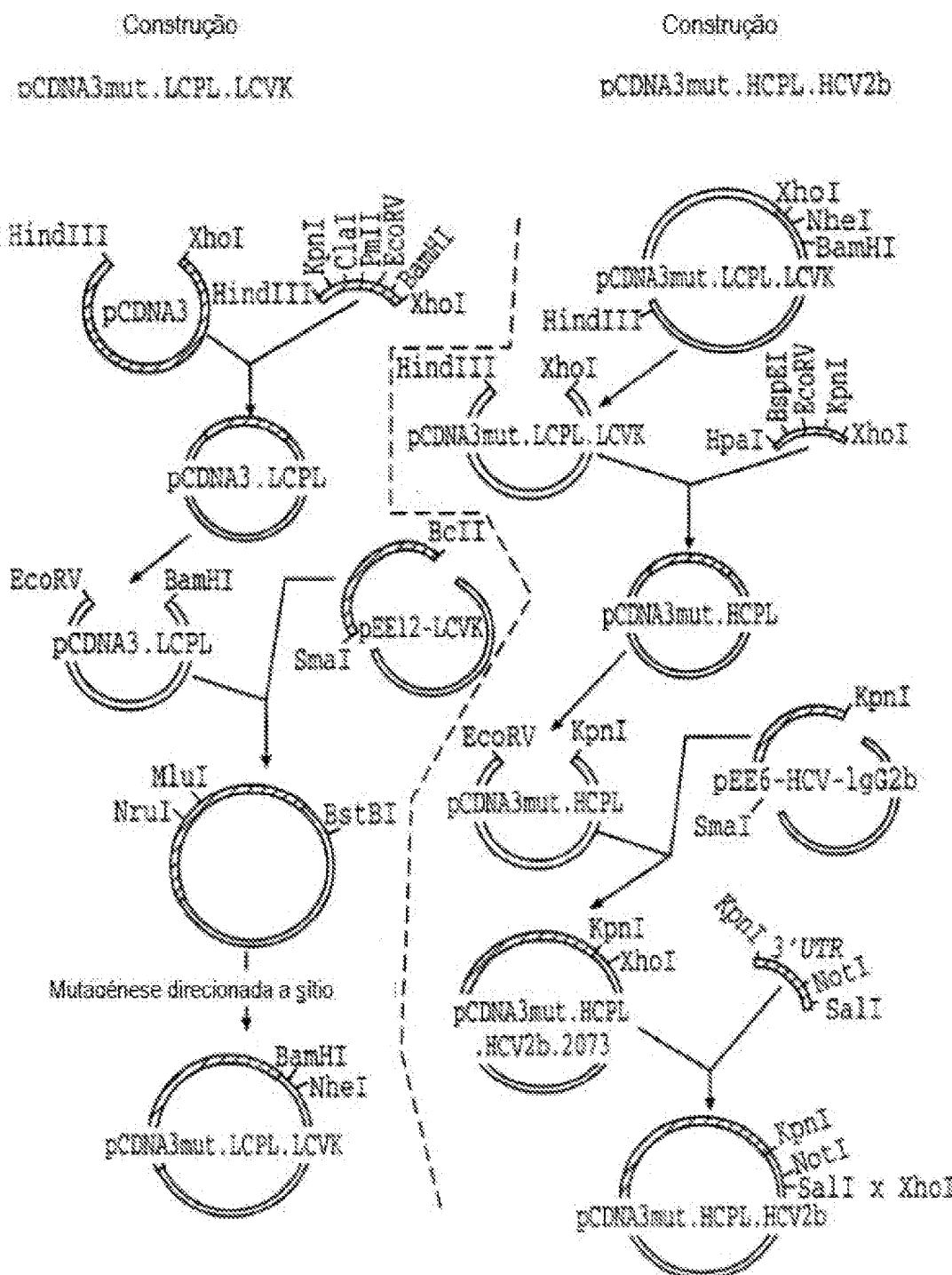
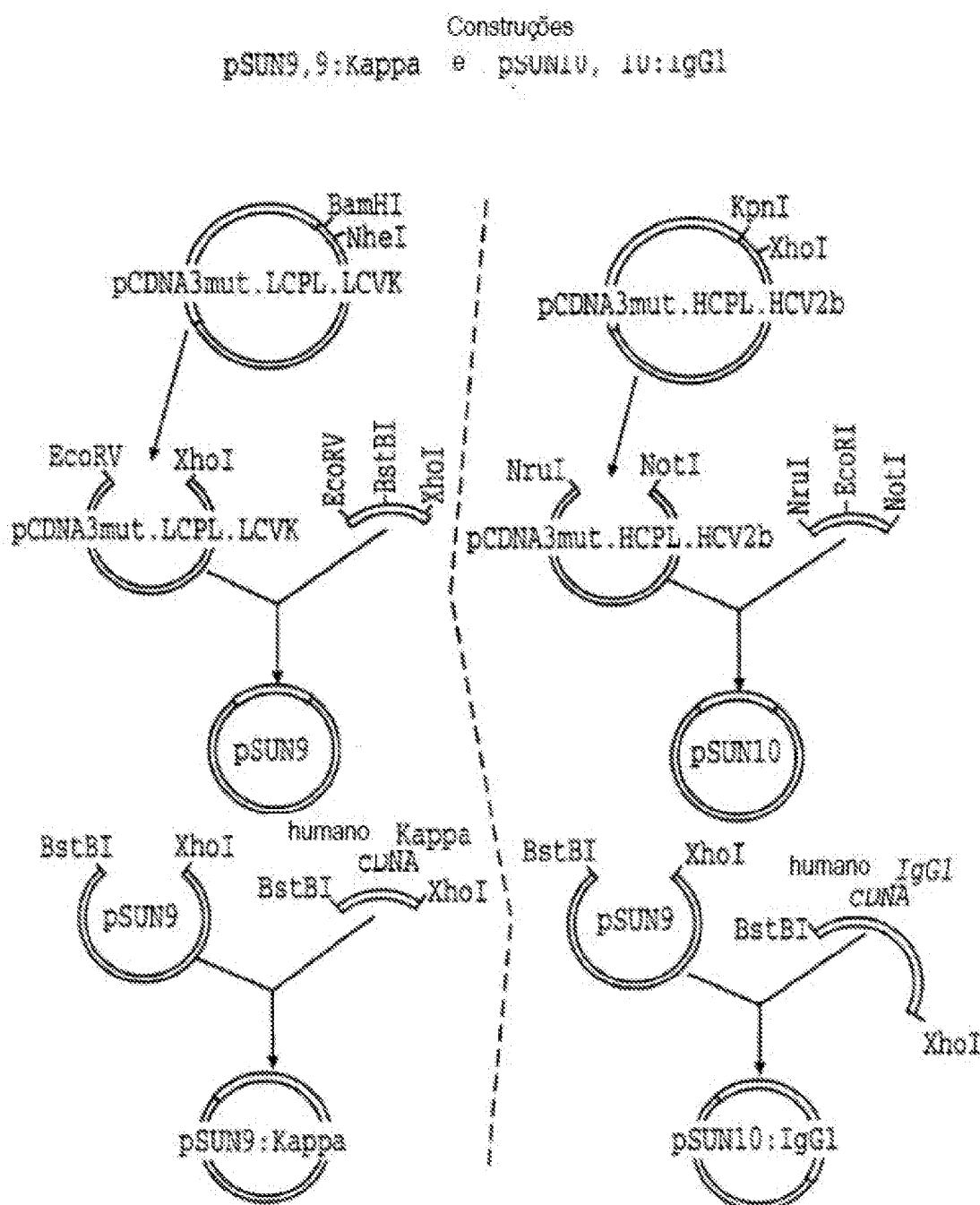


FIG. 11

**FIG. 12****FIG. 13**

**FIG. 14****FIG. 15**

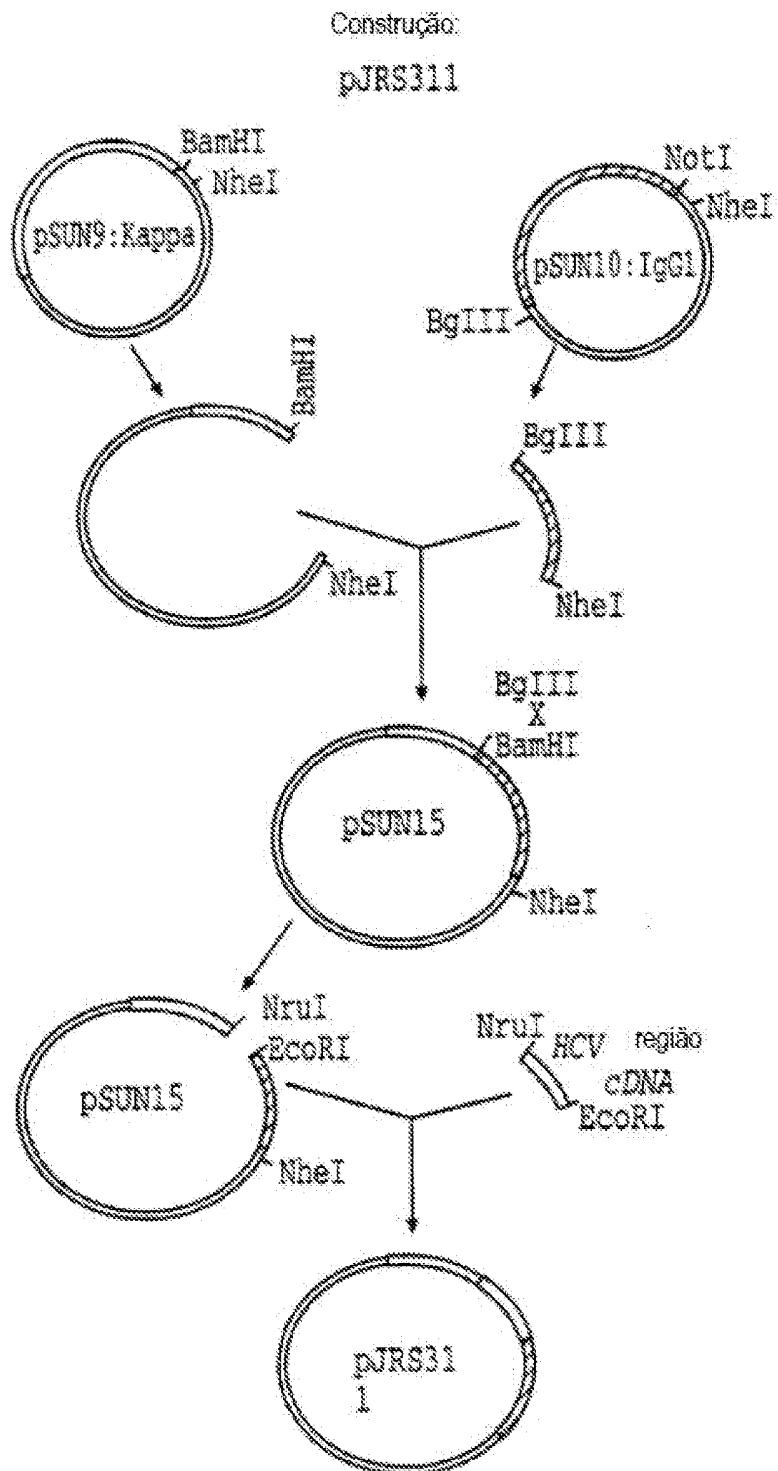
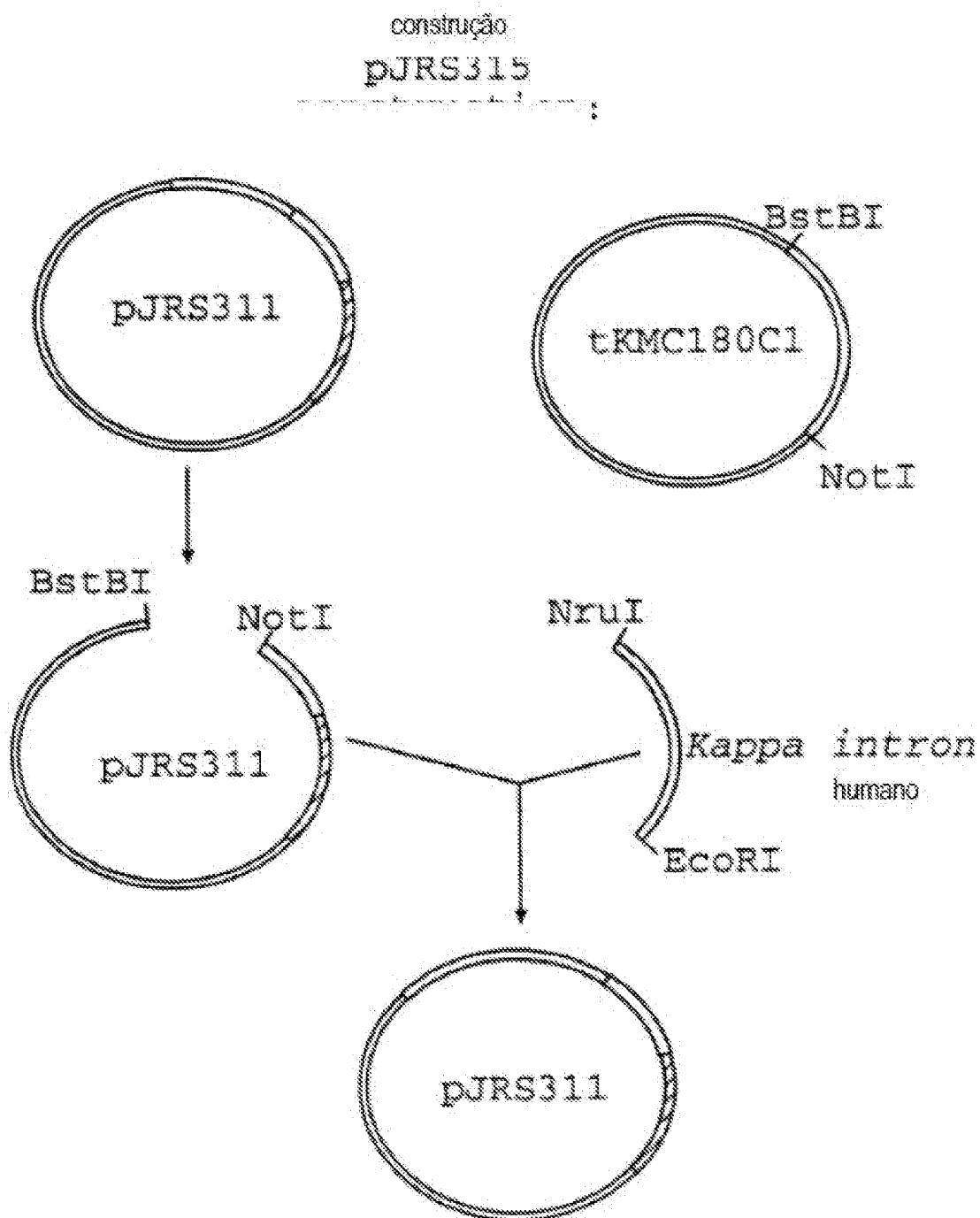


FIG. 16

**FIG. 17**

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 9820903 A
- EP 0239480 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- Spika, J. et al. *J. Pediatr.*, 1986, vol. 108, 287-291
- Remis, R. *Ann. Intern. Med.*, 1984, vol. 101, 624-626
- Riley, L. et al. *N. Engl. J. Med.*, 1983, vol. 308, 681-685
- Centers for Disease Control and Prevention. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 1993, vol. 42, 258
- Doyle et al. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, vol. 53, 2394
- Samadpour et al. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, 1038
- O'Brien ; Holmes. *Microbiol. Rev.*, 1987, vol. 51, 208-220
- Strockbine, N. et al. *Infect. Immun.*, 1986, vol. 53, 135-140
- Lindgren et al. *Infection and Immunology*, 1993, vol. 61, 3632
- Schmitt, C. et al. *Infect. Immun.*, 1991, vol. 59, 1073-1073
- Marques, L. et al. *FEBS Lett.*, 1987, vol. 44, 33-38
- Strockbine et al. *Infection and Immunity*, 1985, vol. 50, 695-700
- Perera et al. *J. Clinical Microbiol.*, 1988, vol. 26, 2127-2131
- Estley A. R. et al. *Lancet*, 1990, vol. 335, 1275-1277
- LoBuglio, P.N.A.S., June 1989, vol. 86, 4230-4234
- Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. U.S. Department of Health and Human Services, 1981, vol. 1
- Strockbine, N. A. et al. *Infection and Immunity*, 1985, vol. 50, 695-700
- Perera, L. P. et al. *J. Clinical Microbiol.*, 1988, vol. 26, 2127-2131
- Near, R. I. et al. *Mol. Immunol.*, 1990, vol. 27, 901-909
- Gentry ; Dairymple. *J. Clin. Microbiol.* 1989, vol. 12, 361-366
- *J. Infect. Disease*, 1991, vol. 164, 344-352
- *Inf. and Immunity*, 1990, vol. 57, 3743-3750
- Schmitt et al. *Infect. and Immunit.*, 1991, vol. 59, 1065-1073
- Fagerberg et al. *Cancer Research*, 1995, vol. 55, 1824-37
- *Eur. J. Cancer*, 1995, vol. 2, 261-267