

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

(22) Data de pedido: **1992.12.02**

(30) Prioridade(s): **1991.12.02 GB 9125579**
1991.12.02 GB 9125582
1992.03.24 GB 9206318
1992.03.24 GB 9206372

(43) Data de publicação do pedido: **2000.08.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.09.10**
248/2008

(73) Titular(es):

MEDICAL RESEARCH COUNCIL
20 PARK CRESCENT LONDON W1B 1AL **GB**
MEDIMMUNE LIMITED **GB**

(72) Inventor(es):

ANDREW DAVID GRIFFITHS **GB**
HENDRICUS RENERUS JACOBUS MATTHEUS
HOOGENBOOM **GB**
JAMES DAVID MARKS **US**
GREGORY PAUL WINTER **GB**
JOHN MCCAFFERTY **GB**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS A PARTIR DE REPORTÓRIOS DE
SEGMENTOS DE ANTICORPO E EXIBIDOS EM FAGOS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO**"Produção de auto-anticorpos a partir de reportórios de segmentos de anticorpo e exibidos em fagos"**

O presente invento refere-se ao isolamento de moléculas de anticorpo dirigidos contra auto-antigénios, em particular anticorpos humanos dirigidos contra auto-antigénios humanos. A tecnologia de exibição em fagos para selecção de moléculas de anticorpo foi descrita em WO92/01047, PCT/GB92/00883, PCT/GB92/01755 e GB9206372.6. Os requerentes constataram que anticorpos dirigidos contra auto-antigénios podem ser isolados utilizando a tecnologia de exibição em fagos.

Auto-anticorpos humanos são de valor particular para fins terapêuticos e de diagnóstico *in vivo*, uma vez que estes evitam os problemas que surgem da antigenicidade de anticorpos estranhos, e.g. de ratinho. Os anticorpos humanos mais úteis para terapia são aqueles dirigidos contra moléculas da superfície celular, tais como receptores, adesinas e integrinas, e aqueles dirigidos contra moléculas efectoras biológicas em circulação, tais como hormonas, factores de crescimento e citoquinas. Tem sido extremamente difícil obter anticorpos humanos contra estes auto-antigénios. Este invento proporciona uma via poderosa para obtenção destes anticorpos.

É uma tarefa exigente isolar um fragmento de anticorpo com especificidade contra um auto-antigénio. Os animais não produzem normalmente anticorpos para auto-antigénios, um fenómeno denominado tolerância (G.J. Nossal *Science* 245 147-153, 1989). Doenças auto-imunes podem resultar de um colapso na tolerância. Em geral, a vacinação com um auto-antigénio não resulta na produção de anticorpos em circulação. É deste modo difícil criar anticorpos para auto-antigénios, particularmente em humanos. É possível criar anticorpos que reconhecem antigénios humanos num animal tal como um ratinho, especialmente se o antigénio humano não estiver intimamente relacionado com qualquer equivalente no animal. Se é depois requerido um anticorpo humano é necessário "humanizar" o anticorpo, e.g. por enxerto de CDR (Patente GB2188638B).

A tecnologia de anticorpo de fago como descrita em (WO92/01047) oferece a capacidade para isolar estes anticorpos humanos directamente. Neste pedido de patente, demonstramos pela primeira vez que anticorpos contra auto-antigénios podem

ser isolados a partir de bibliotecas de fago obtidas, por exemplo, a partir de fontes não imunizadas e a partir de bibliotecas preparadas por recombinação sintética de sequências de gene V, preferivelmente recombinação de sequências VH com DH e JH, e VL com JL. Estes anticorpos são específicos para o seu antígeno. Este pedido de patente mostra que bibliotecas individuais obtidas deste modo podem actuar como uma fonte tanto de antígenos estranhos como de auto-antígenos e abre a perspectiva de uma grande biblioteca universal para isolar anticorpos para qualquer antígeno.

No pedido de patente WO92/01047 foi revelado que fragmentos de anticorpo podem ser exibidos sobre a superfície de um bacteriófago e que estes se ligarão a antígeno. Fragmentos de anticorpo podem ser seleccionados directamente utilizando esta característica. Esta capacidade para isolar fragmentos de anticorpo (Fab, Fv, scFv e VH) utilizando a sua exibição sobre a superfície de um bacteriófago filamentoso tem aberto a perspectiva do isolamento de especificidades de anticorpo (*i.e.* anticorpos dirigidos contra um antígeno particular) que eram difíceis ou impossíveis de isolar anteriormente. Em particular, a WO92/01047 demonstra que especificidades de anticorpo podem ser isoladas a partir de um humano que não foi especificamente imunizado ("não imunizado"), mesmo especificidades para antígenos tais como 2-fenil-5-oxazolona aos quais os humanos não estarão normalmente expostos.

Em concretizações deste invento, reportórios de anticorpos sintéticos obtidos a partir de sequências humanas são exibidos sobre a superfície de um bacteriófago filamentoso, aqui denominado como um pacote de exibição genética replicável (*rgdp, replicable genetic display package*) e a especificidade de ligação auto é seleccionada por ligação a auto-antígeno. Neste processo, os reportórios de gene V são obtidos a partir de genes V de linha germinal rearranjados *in vitro* ou *in vivo* e ou por mutação de (a) gene(s) V rearranjados(s). Uma particularidade dos reportórios de gene V é que estes têm sequências extremamente diversificadas, usualmente mais de 10^6 membros diferentes. De facto, é possível que uma biblioteca suficientemente grande possa proporcionar uma fonte de especificidades dirigidas contra qualquer auto-antígeno. Os reportórios de gene V são clonados no *rgdp* um vector de fago filamentoso) tal que os reportórios de anticorpo são exibidos sobre a superfície do *rgdp*. Os *rgdp*,

codificando especificidades raras de auto-anticorpo de ligação, podem ser seleccionados em virtude da ligação ao auto-antigénio. Os reportórios de anticorpo podem ser clonados numa replicação individual ou num formato de replicação dual como descrito em W092/01047 e PCT/GB92/00883.

Os genes V podem ser clonados no material genético do rgdp, e expressos como domínios variáveis de cadeia pesada e leve de anticorpo associados.

Os dois domínios podem ser exibidos como cadeias polipeptídicas separadas (ligadas como em fragmentos Fab através de associação não covalente de domínios e/ou pontes de dissulfureto), ou como parte da mesma cadeia (fragmentos Fv cadeia simples onde os dois domínios estão contidos na mesma cadeia polipeptídica).

Em W092/01047 e nos Exemplos 1 a 8 deste pedido de patente utilizámos fusão de fragmentos de anticorpo com proteína de gene 3 de bacteriófago filamentosos para exibição e selecção de fragmentos de anticorpo. Uma abordagem alternativa seria fundir fragmentos de anticorpo à proteína de gene 8 ou a outras moléculas de superfície de um bacteriófago filamentosos.

O isolamento de anticorpos humanos dirigidos contra antigénios humanos é uma tarefa exigente. Existe apenas um número limitado de antigénios humanos contra os quais se encontram naturalmente anticorpos humanos em circulação. Estão presentes anticorpos dirigidos contra não auto-antigénios de origem humana. Anticorpos dirigidos contra sangue humano do grupo B foram isolados a partir de uma biblioteca de exibição em fagos preparada a partir de sujeitos do grupo sanguíneo O (J.D. Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222 581-597, 1991), que reconhecem o antigénio do grupo sanguíneo B como estranho.

Este invento refere-se a um método geral para o isolamento de anticorpos dirigidos contra auto-antigénios que são específicos para o antigénio envolvido. Muitos pacientes mostram concentrações significativas de auto-anticorpos em circulação. Estima-se que 10 a 30% dos linfócitos B em indivíduos saudáveis, normais, estejam envolvidos na produção de auto-anticorpos (I.R. Cohen e A. Cooke *Immunol. Today* 7 363-364, 1986). No entanto, os "auto-anticorpos naturais" produzidos não se prestam a utilização terapêutica na medida em que eles são frequentemente IgM, de baixa afinidade e poli-

reactiva (P. Casali e A.L. Notkins, *Ann. Rev. Immunol.* 7 515-531, 1989; S. Avrameas, *Immunol. Today* 12 154-159). Uma resposta imunitária contra auto-antigénios pode resultar em doença auto-imune ou em infecções posteriores, e alguns anticorpos monoclonais dirigidos contra auto-antigénios têm sido isolados a partir de pacientes com doença auto-imune (K. James & G. T. Bell *J. Immunol. Methods* 100 5-40, 1987). Estes auto-anticorpos são frequentemente específicos, mas podem-se ligar apenas a uma gama limitada de epítomos no antigénio (M. Bouanani *et al.*, *Arthritis Rheum.* 34 1585-1593, 1991).

A preparação de bibliotecas de gene V, obtidas a partir do ARNm de células de plasma segregando anticorpo IgG (ou IgM), pode assim conduzir ao isolamento de fragmentos de anticorpo obtidos a partir de auto-anticorpos. Por exemplo, auto-anticorpos podem ser isolados a partir de pacientes com doenças auto-imunes, por exemplo, seria de esperar que anticorpos anti-receptor de acetilcolina fossem isolados a partir de reportórios de anticorpo preparados a partir do ARNm de IgG de pacientes com miastenia grave. Por exemplo, um fragmento de anticorpo específico de peroxidase de tiróide humana foi isolado a partir de uma biblioteca de bacteriófago lambda a partir de um paciente com doença auto-imune da tiróide (S. Portolano *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 372-377, 1991). No entanto, isto requereu um extenso rastreio de 200 000 placas para obter um clone. Adicionalmente, esta biblioteca foi obtida a partir de tecido de tiróide, um procedimento não facilmente aplicável na maioria dos casos.

Em contraste, o poder de selecção disponível utilizando o sistema de fago, demonstrado na W092/01047, permite o fácil isolamento de auto-anticorpos a partir do ARNm de IgM de linfócitos de sangue periférico de um dador sem doença. No exemplo de referência 2 mostramos que anticorpos que se ligam a tiroglobulina humana (que pode ser encontrada nos soros de pessoas com ou sem doença auto-imune sintomática) podem ser isolados a partir de reportórios de fago preparados a partir de humanos não imunizados. Não era necessariamente de esperar que fosse possível obter anticorpos para tiroglobulina humana por imunização de um humano com tiroglobulina humana, não obstante a presença de auto-anticorpos de tiroglobulina em muitas pessoas. Tem sido noticiado que auto-anticorpos contra tiroglobulina em soros normais têm muitas vezes um elevado grau de poli-reactividade (S. Avrameas, 1991 *supra*). Em

contraste, aqueles que são isolados no exemplo de referência 2, por exemplo, são específicos para tiroglobulina.

Neste pedido de patente, demonstramos também que mesmo anticorpos contra factor- α de necrose de tumor humano podem ser isolados como descrito no exemplo de referência 1 a partir da mesma biblioteca que os anticorpos dirigidos contra tiroglobulina. Muitos auto-antígenos não possuem auto-anticorpos associados detectáveis em circulação. Adicionalmente, o exemplo de referência 3 mostra o isolamento de anticorpos contra os auto-antígenos mucina, antígeno carcinoembrionário (CEA) e CD4, contra os quais não foram noticiados anticorpos em soros normais. Para além disso, estes anticorpos são específicos, enquanto existe frequentemente um elevado grau de poli-reactividade nos auto-anticorpos naturais que podem por vezes ser encontrados. A vasta maioria de auto-antígenos não possui auto-anticorpos associados detectáveis em circulação. Assim, o isolamento de auto-anticorpos como descrito neste invento abre a perspectiva do isolamento directo de anticorpos humanos de ligação a antígenos humanos para vários fins, tais como anticorpos que se ligam a hormonas em circulação para bloquear, modificar ou potenciar a sua acção, ou anticorpos que se ligam a um antígeno na superfície celular para visualização ou morte, por exemplo, de células de cancro.

A origem dos genes V que contribuem para os auto-anticorpos isolados a partir de bibliotecas de exibição em fagos não é clara. A tolerância a auto-antígenos pelo sistema imunitário (impedindo a geração de anticorpos dirigidos contra eles) é mediada quer por deleção clonal quer por inactivação funcional (anergia) de linfócitos B auto-reactivos (D.A. Nemazee & K. Burki *Nature* 337 562-566, 1989; C.C. Goodnow *et al.*, *Nature* 334 676-682, 1988; S.B. Hartley *et al.*, *Nature* 353 765-769, 1991; D.M. Russell *et al.*, *Nature* 354 308-311, 1991). Em qualquer caso, pouco auto-anticorpo em circulação é detectável para a maioria dos antígenos. No entanto, no caso de anergia, células auto-reactivas inactivadas funcionalmente a partir da linhagem de células B persistem em órgãos linfóides periféricos conduzindo a células B em circulação. Estes linfócitos raros com especificidade anti-próprio podem proporcionar parceiros de cadeia pesada ou leve (ou mesmo ambas) para anticorpos em fagos com especificidades anti-próprio. Alternativamente, estas especificidades anti-próprio podem resultar da combinação na biblioteca de um domínio VH

com um domínio VL para proporcionar uma especificidade que é normalmente eliminada se ocorrer na natureza. Por esta razão, bibliotecas combinatórias e bibliotecas "de cadeias baralhadas" ("*chain-shuffle*"), tal como descrito no pedido de patente W092/01047, podem ser uma fonte particularmente rica de auto-anticorpos. Um procedimento de selecção de grande potência, tal como o proporcionado por anticorpos de fago, é requerida para obter estes auto-anticorpos raros.

O grau de mutação somática observada em fragmentos de auto-anticorpos isolados por tecnologia de fagos neste pedido de patente indica que alguns possuem sequências de linha germinal e resultaram deste modo de células B virgens. Outros anticorpos isolados por tecnologia de anticorpo de fago neste pedido de patente mostram hipermutação somática indicando que os genes V foram estimulados por antigénio, quer um antigénio estranho reactivo de modo cruzado, quer outros antigénios estranhos. Em ambos os casos, os fragmentos de anticorpo isolados utilizando a tecnologia de fago serão usualmente uma combinação de domínios VH e VL não originalmente presentes nos linfócitos B e o poder da tecnologia de fago, como descrito neste pedido de patente, permite o seu isolamento.

De acordo com o presente invento, é proporcionado um método de acordo com a reivindicação 1.

A parte componente de polipéptido codificada pelo ácido nucleico em cada bacteriófago filamentoso (rgdp) pode ser um domínio VH ou VL de um anticorpo, ou qualquer parte de um anticorpo que, quer sozinha quer em combinação com uma ou mais outras partes componentes, forma um fragmento de anticorpo que é capaz de se ligar a um antigénio. Exemplos de cadeias polipeptídicas que podem ser utilizada como partes componentes de um membro de sbp como acima descrito, incluem deste modo, para além dos domínios VH e VL, $V_L C_L$, $V_H C_H1$, fragmentos scFv, fragmentos Fab e outros.

Cada referido membro de sbp exibido na superfície de um rgdp pode ser um fragmento de anticorpo compreendendo um domínio V_H e um domínio V_L .

Cada fragmento de anticorpo pode ser um fragmento scFv, um fragmento Fab, um fragmento Fv consistindo do domínio V_L e V_H de um braço individual de um anticorpo, ou qualquer outro

fragmento que tenha a capacidade de se ligar a um epítopo ou antigénio.

O passo de proporcionar uma biblioteca de rgdp pode compreender:

combinação de (i) uma primeira parte componente de cadeia polipeptídica de um membro de sbp fundido a um componente de um rgdp que desse modo exhibe a referida primeira parte componente de cadeia polipeptídica ou sua população na superfície de rgdp por expressão num organismo de célula hospedeira recombinante, ou uma população de uma tal primeira parte componente de cadeia polipeptídica fundida a um referido componente de um rgdp, com (ii) uma segunda parte componente de cadeia polipeptídica de um membro de sbp ou uma população de uma tal segunda parte componente de cadeia polipeptídica, para formar uma biblioteca de membros de sbp exibida na superfície de rgdp;

pelo menos uma das referidas primeira ou segunda partes componentes de cadeia polipeptídica ou suas populações sendo codificadas por ácido nucleico que é susceptível de ser empacotado utilizando o referido componente de um rgdp.

O passo de proporcionar uma biblioteca de rgdp pode compreender:

expressão num organismo hospedeiro recombinante de uma primeira parte componente de cadeia polipeptídica de um membro de sbp ou uma população de uma tal primeira parte componente de cadeia polipeptídica, fundida a um componente de um rgdp que desse modo exhibe a referida parte componente de cadeia polipeptídica na superfície de rgdp;

combinação da referida primeira parte componente de cadeia polipeptídica ou população com uma segunda parte componente de cadeia polipeptídica de um membro de sbp ou uma população de uma tal segunda parte componente de cadeia polipeptídica, para formar uma biblioteca de rgdp cada um exibindo um membro de sbp na sua superfície, pelo menos uma das referidas partes componentes de cadeia polipeptídica sendo expressa a partir de ácido nucleico que é susceptível de ser empacotado utilizando o referido componente de um rgdp.

Quando o membro de sbp é um fragmento Fab, a primeira e segunda partes componentes de cadeia polipeptídica podem ser um polipéptido consistindo de um domínio V_L e um domínio C_L , e a segunda parte componente de cadeia polipeptídica um polipéptido consistindo de um domínio V_H e um domínio C_H1 .

A combinação da primeira e segunda partes componentes de cadeia polipeptídica ou suas populações pode ser ao nível de ácido nucleico, com vectores de expressão cada um possuindo aí introduzidas uma sequência codificando uma primeira parte componente e uma sequência codificando uma segunda parte componente. Por outro lado, a combinação pode ser ao nível do polipéptido com as primeiras partes componentes não sendo expressas a partir dos mesmos vectores que as segundas partes componentes. De facto, uma ou outra das primeira e segunda partes componentes pode ser proporcionada como uma biblioteca solúvel. Detalhes de vários formatos que podem ser utilizado são apresentados em W092/01047 e PCT/GB92/00883.

O passo de proporcionar uma biblioteca pode compreender:

combinação de (i) ácido nucleico que codifica um primeiro componente de cadeia polipeptídica de um membro de sbp fundido a um componente de um rgdp ou uma população de uma tal primeira parte componente de cadeia polipeptídica fundida a um componente de um rgdp, com (ii) ácido nucleico codificando uma segunda parte componente de cadeia polipeptídica de um membro de sbp ou uma sua população, para formar uma biblioteca de ácido nucleico, ácido nucleico da referida biblioteca sendo susceptível de ser empacotado utilizando o referido componente de um rgdp;

expressão num organismo hospedeiro recombinante da referida primeira parte componente de cadeia polipeptídica fundida a um componente de um rgdp ou sua população e da referida segunda parte componente de cadeia polipeptídica de um membro de sbp ou uma sua população, para produzir uma biblioteca de rgdp cada um exibindo na sua superfície um membro de sbp e contendo ácido nucleico codificando uma primeira e uma segunda parte componente de cadeia polipeptídica do membro de sbp exibido na sua superfície.

Recomenda-se aos leitores que consultem W092/01047, em particular, se pretenderem detalhes adicionais de qualquer método aqui descrito.

Numa concretização do presente invento ambas as primeira e segunda partes componentes de cadeia polipeptídica ou suas populações são expressas a partir de ácido nucleico susceptível de ser empacotado utilizando o referido componente de um rgdp. Isto pode suceder quando as partes componentes em conjunto formam um fragmento Fab ou, mais usualmente, quando cada referido membro de sbp exibido na superfície de um rgdp é um fragmento de anticorpo scFv.

Numa concretização, cada referida segunda parte componente de cadeia polipeptídica ou sua população pode ser expressa a partir de ácido nucleico separado do ácido nucleico a partir do qual a referida primeira parte componente de cadeia polipeptídica ou sua população é expressa. O ácido nucleico codificando a primeira parte componente de cadeia polipeptídica pode estar no mesmo vector de expressão que o ácido nucleico codificando a segunda parte componente de cadeia polipeptídica, mas separada deste tal que, por exemplo, são produzidos fragmentos Fab. Alternativamente, o ácido nucleico codificando a primeira parte componente de cadeia polipeptídica pode estar num vector de expressão diferente do ácido nucleico que codifica uma segunda parte componente de cadeia polipeptídica. Quando a primeira e segunda partes componentes de cadeia polipeptídica são ambas codificadas no mesmo vector de expressão então estas podem ser expressas como fragmentos scFv, onde um domínio VH está unido a um domínio VL por um ligante polipeptídico, tal que cada scFv é uma cadeia polipeptídica única.

Cada membro de sbp exibido na superfície de um rgdp é um fragmento de anticorpo Fab.

O ácido nucleico é obtido a partir de humano. É muito difícil obter anticorpos que reconheçam (*i.e.* se liguem especificamente) a auto-antígenos humanos.

O ácido nucleico é obtido a partir de uma biblioteca preparada por recombinação artificial ou sintética de sequências de gene V de linha germinal V. A biblioteca pode ser totalmente sintética.

Membros de sbp seleccionados em (b) exibidos na superfície de rgdp podem ser seleccionados ou rastreados para proporcionar um membro de sbp individual ou uma população mista dos referidos membros de sbp associados nos seus rgdp

respectivos com ácido nucleico codificando o referido membro de sbp ou uma sua cadeia polipeptídica. Fagos de rgdp exibindo membros de sbp seleccionados em (b) podem ser cultivados para aumentar os seus números antes de qualquer selecção ou rastreio adicionais subsequentes. Ácido nucleico que codifica um membro de sbp seleccionado ou rastreado, e que é obtido a partir de um rgdp que exhibe na sua superfície um membro de sbp seleccionado ou rastreado, pode ser utilizado para expressar um membro de sbp ou um fragmento de um seu derivado num organismo hospedeiro recombinante.

O presente invento abrange qualquer método onde ácido nucleico a partir de um ou mais rgdp seleccionados entre a biblioteca por ligação com um auto-antigénio é retirado e utilizado para proporcionar ácido nucleico de codificação num método adicional (de acordo com qualquer concretização do presente invento ou não) para obter um membro de sbp individual ou uma população mista de membros de sbp, ou ácido nucleico para sua codificação.

O produto final de expressão, membro de sbp seleccionado, pode ser modificado para produzir um seu derivado.

O produto final de expressão ou seu derivado podem ser utilizados para preparar um medicamento terapêutico ou profiláctico ou um produto de diagnóstico.

O presente invento abrange também fragmentos de anticorpo, seus derivados, incluindo anticorpos inteiros e fusões com enzimas, obtidos utilizando qualquer método aqui descrito de acordo com o presente invento.

De acordo com um aspecto da presente revelação, é proporcionada a utilização, em qualquer método de acordo com qualquer concretização do presente invento aqui descrita, de um *kit* compreendendo uma biblioteca de vectores cada um compreendendo ácido nucleico que é susceptível de ser empacotado em rgdp e que codifica uma parte componente de cadeia polipeptídica de um anticorpo para exibição na superfície de rgdp.

Pela presente revelação, é também proporcionada, em qualquer método de acordo com qualquer concretização do presente invento aqui descrita, a utilização de um *kit* compreendendo uma biblioteca de rgdp cada um contendo ácido

nucleico codificando pelo menos uma parte componente de cadeia polipeptídica de um anticorpo.

A presente revelação proporciona genericamente um método para produzir um pacote de exibição genética replicável (rgdp) ou uma população destes rgdp, método que compreende os passos de:

- (a) inserção de uma sequência de nucleótidos codificando uma molécula de ligação que é um membro de um par de ligação específica e um auto-anticorpo, num genoma viral;
- (b) cultura do vírus contendo a referida sequência de nucleótidos tal que a referida molécula de ligação é expressa e exibida pelo vírus na sua superfície.

O presente invento abrange também um método para seleccionar um rgdp específico para um epítipo de auto-antigénio particular que compreende produzir uma população destes rgdp e o passo adicional de selecção quanto à referida molécula de ligação que é um auto-anticorpo por contacto da população com o referido epítipo tal que rgdp individuais com a especificidade desejada se possam ligar ao referido epítipo. O método pode compreender um ou mais dos passos adicionais de: (i) separação de quaisquer rgdp ligados do epítipo; (ii) recuperação de quaisquer rgdp separados e (iii) utilização das sequências de nucleótidos inseridas a partir de quaisquer rgdp separados num sistema recombinante para produzir a molécula de ligação separada do vírus. O passo de selecção pode isolar a sequência de nucleótidos codificando a molécula de ligação de especificidade desejada, em virtude da referida molécula de ligação ser expressa em associação com a superfície do vírus no qual está contido o referido ácido nucleico de codificação.

A presente revelação proporciona também um método de produção de um membro multimérico de um par de ligação específica (sbp, do inglês "*specific binding pair*") que é um auto-anticorpo, método que compreende:

expressão num organismo hospedeiro recombinante de uma primeira cadeia polipeptídica do referido membro de sbp ou de uma população geneticamente diversificada do referido membro de sbp fundida a um componente de um pacote de exibição genética replicável (rgdp) segregado que desse modo exhibe o referido polipéptido na superfície do pacote, e expressão num organismo hospedeiro recombinante de uma segunda cadeia

polipeptídica do referido multímero e fazer com que ou permitir que as cadeias polipeptídicas se juntem para formar o referido multímero como parte do referido rgdp, pelo menos uma das referidas cadeias polipeptídicas sendo expressa a partir de ácido nucleico que é susceptível de ser empacotado utilizando o referido componente para esse fim, tal que o material genético de cada referido rgdp codifica uma referida cadeia polipeptídica.

Ambas as referidas cadeias podem ser expressas no mesmo organismo hospedeiro.

As primeira e segunda cadeias do referido multímero podem ser expressas como cadeias separadas a partir de um único vector contendo o seu ácido nucleico respectivo.

Pelo menos uma das referidas cadeias polipeptídicas (ou partes componentes de cadeia polipeptídica) pode ser expressa a partir de um vector de fago.

Pelo menos uma das referidas cadeias polipeptídicas pode ser expressa a partir de um vector de fagemídico, o método incluindo a utilização de um fago auxiliar, ou um plasmídeo expressando genes de fago de complementação, para auxiliar a empacotar o referido genoma de fagemídeo, e o referido componente do rgdp é uma proteína de cápside para esse fim. A proteína da cápside pode estar ausente, ser deficiente ou condicionalmente deficiente no fago auxiliar.

O método pode compreender a introdução de um vector capaz de expressar a referida primeira cadeia polipeptídica, num organismo hospedeiro que expressa a referida segunda cadeia polipeptídica em forma livre, ou a introdução de um vector capaz de expressar o referido segundo polipéptido em forma livre num organismo hospedeiro que expressa a referida primeira cadeia polipeptídica.

Cada uma das cadeias polipeptídicas pode ser expressa a partir de ácido nucleico que é susceptível de ser empacotado como um rgdp utilizando o referido produto de fusão componente, pelo que ácidos nucleicos codificando ambas as referidas cadeias polipeptídicas são empacotados nos rgdp respectivos.

As fusões podem ser expressas na ausência do componente de exibição de rgdp, talvez um componente da cápside, expresso na forma do tipo selvagem.

A proteína de cápside pode estar ausente, ser deficiente ou condicionalmente deficiente no fago auxiliar.

A célula hospedeira pode ser uma estirpe mutadora que introduz diversidade genética no ácido nucleico do membro de sbp.

O rgdp é um bacteriófago filamentosos, o hospedeiro pode ser uma bactéria, e o referido componente do rgdp uma proteína da cápside para o bacteriófago. O fago pode ser seleccionado entre os fagos de classe I fd, M13, f1, If1, lke, ZJ/Z, Ff e os fagos de classe II Xf, Pf1 e Pf3. O fago pode ser fd ou um derivado de fd. O derivado pode ser resistente à tetraciclina. O referido membro de sbp ou sua cadeia polipeptídica pode ser expresso como uma fusão com a proteína da cápside de gene III de fago fd ou o seu correspondente noutro fago filamentosos. O membro de sbp ou sua cadeia polipeptídica pode ser inserido na região N-terminal da proteína da cápside madura a jusante de um péptido líder secretor. A sequência pode ser inserida após o aminoácido +1 da proteína madura. O local para inserção pode estar flanqueado por sequências curtas correspondendo a sequências que ocorrem em cada extremidade do ácido nucleico a ser inserido.

O hospedeiro pode ser *E. coli*.

Ácido nucleico codificando um polipéptido de membro de sbp pode ser ligado a jusante a uma proteína da cápside viral através de um codão de paragem da tradução suprimível tal que, sob condições em que a paragem é suprimida são produzidas proteínas de fusão compreendendo polipéptido de membro de sbp e proteína da cápside viral, enquanto, sob condições de não supressão, são produzidos polipéptidos de membro de sbp na forma livre.

Noutros locais neste texto descrevem-se sistemas de selecção e formatos de ensaio. Nestes sistemas e formatos, a sequência de gene codificando a molécula de ligação (e.g. o anticorpo) de especificidade desejada é separada de uma população geral de rgdp possuindo uma gama de especificidades, pelo facto de a sua ligação a um alvo específico (e.g. o

antigénio ou epítopo). Assim, os rgdp formados pela referida expressão podem ser seleccionados ou rastreados para proporcionar um membro de sbp individual ou uma população mista seleccionada de referidos membros de sbp associados nos seus rgdp respectivos com ácido nucleico codificando o referido membro de sbp ou uma sua cadeia polipeptídica. Os rgdp podem ser seleccionados por afinidade com um membro complementar do referido membro de sbp.

Quaisquer rgdp ligados ao referido segundo membro podem ser recuperados por lavagem com um eluente. As condições de lavagem podem ser variadas de modo a obter rgdp com diferentes afinidades de ligação pelo referido epítopo. Alternativamente, para obter e.g. rgdp de elevada afinidade, o membro complementar (e.g. um epítopo) pode ser apresentado à população de rgdp (e.g. pAb) já ligados a um membro de ligação caso em que pAb com uma afinidade mais elevada pelo epítopo deslocarão o membro de ligação já ligado. Assim, o eluente pode conter uma molécula que compete com o referido rgdp pela ligação ao membro de sbp complementar. O rgdp pode ser aplicado ao referido membro de sbp complementar na presença de uma molécula que compete com o referido pacote pela ligação ao referido membro de sbp complementar. Pode-se utilizar ácido nucleico derivado de um rgdp seleccionado ou rastreado para expressar o referido membro de sbp ou um seu fragmento ou derivado num organismo hospedeiro recombinante. Ácido nucleico a partir de um ou mais rgdp pode ser retirado e utilizado para proporcionar ácido nucleico de codificação num referido método adicional para obter um membro de sbp individual ou uma população mista de membros de sbp, ou ácido nucleico de codificação para esse fim. O produto final de expressão pode ser modificado para produzir um seu derivado.

Uma fonte preferida para a geração de diversas bibliotecas a partir de humanos não imunizados é ARNm de IgM. No exemplo 43 de W092/01047 constata-se que fragmentos de anticorpo dirigidos contra lisozima de ovo de peru e 2-fenil-5-oxazolona foram muito mais facilmente isolados de uma biblioteca de fago obtida a partir do ARNm de IgM de doadores humanos não imunizados, do que de uma biblioteca preparada a partir de ARNm de IgG. Adicionalmente, não se conseguiram isolar quaisquer fragmentos de anticorpo de ligação a 2-fenil-5-oxazolona a partir de uma biblioteca de 2000000 clones de anticorpo de fago preparados a partir de ARNm de IgG de ratinhos não imunizados (T. Clackson *et al.*, *Nature* 352 624-

628, 1991). Os Exemplos de referência 1 a 3 deste pedido de patente mostram o isolamento de anticorpos específicos de auto-antigénio a partir da biblioteca de IgM. Ainda que nestas amostras tenham sido seleccionadas especificidades anti-próprias como fragmentos Fv de cadeia simples num formato de replicação individual, podiam ser seleccionadas especificidades de anticorpo como fragmentos Fab num formato de replicação individual ou num formato de replicação dual, combinatório dual (Hoogenboom et al., 1991 *supra*) por exemplo utilizando recombinação com o sistema loxP (PCT/GB92/00883).

Podem ser preparadas bibliotecas de fago que estão enriquecidas em anticorpos dirigidos contra auto-antigénios. Os linfócitos B expressam IgM de superfície e IgD de superfície antes da estimulação com antigénio mas expressam pouca IgM ou IgD solúvel. Estas células não estimuladas conterão mais provavelmente genes de anticorpo com especificidades anti-próprias. Em contraste, células de plasma diferenciadas terminalmente que segregam anticorpos solúveis expressam pouca imunoglobulina de superfície. A preparação de ADNc para preparação de biblioteca de fago utilizando iniciadores que são específicos para IgM de superfície ou IgD de superfície produzirá um reportório de genes de anticorpo enriquecidos nos genes não seleccionados naíves, codificando domínios V. Em linfócitos B que foram silenciados funcionalmente por exposição a auto-antigénio existem níveis grandemente reduzidos de IgM de superfície mas níveis inalterados de IgD de superfície (C.C. Goodnow et al. *supra*). Deste modo, um iniciador específico para IgD de superfície pode ser particularmente adequado para isolamento de auto-anticorpos.

Contudo, como demonstrado neste pedido de patente, ARNm de IgM a partir de linfócitos de sangue periférico não seleccionados é uma fonte preferida de genes V para especificidades anti-próprias. Outras fontes destes auto-anticorpos podem ser ARNm fetal ou ARNm de sangue de cordão umbilical (P.M. Lydyard et al., *Scand. J. Immunol.* 31 33-43, 1990).

Existe o potencial para a produção de reportórios para exibição em fagos utilizando a combinação original de domínios VH e VL pela utilização de PCR e ligação dos genes que os codificam dentro de células expressando estes domínios. O princípio de "PCR na célula", onde o emparelhamento VH/VL

original é mantido, foi demonstrado em PCT/GB92/01483 e descrito em Embleton *et al.*, em *Nucleic Acids Res.*, 20, 3831-3837, 1992. Isto pode ser particularmente útil se puderem ser seleccionados linfócitos numa fase antes da deleção de clones exprimido auto-anticorpos.

Neste invento, utilizam-se bibliotecas de sequência de gene V de linha germinal preparadas pela recombinação sintética de segmentos V, D e J. Estas actuam como uma fonte rica de auto-anticorpos. Nos Exemplos 5 a 7, demonstramos que especificidades anti-próprias contra TNF, anticorpo anti-rhesus D humano (OAK3) e tiroglobulina humana podem ser isoladas a partir de uma biblioteca de anticorpos de fago preparada pela junção sintética de segmentos V, D e J. A utilização de genes V de linha germinal para este propósito, como se mostra nos Exemplos 5 a 7, deverá ser valiosa para o isolamento de auto-anticorpos uma vez que existe alguma evidência de que linfócitos B dirigidos contra auto-antígenos solúveis estão silenciados funcionalmente e aqueles dirigidos contra auto-antígeno multivalente ligado a membrana são eliminados (S.B. Hartley *et al.*, *supra*; D.M. Russell *et al.*, *supra*). Assim, a utilização de bibliotecas sintéticas preparadas por recombinação de VH, DH, JH ou VK, JK ou VL, JL *in vitro* ou seu equivalente podem ser particularmente vantajosas para isolamento de anticorpos dirigidos contra auto-antígenos multivalentes ligados a membrana.

Nos Exemplos 5 a 7 utilizámos segmentos VH CDR3 sintéticos incorporando sequências de bases aleatórias na região de junção V-D-J e ligámos estes a segmentos de gene VH de linha germinal. Podem ser utilizadas outras estratégias tais como preparação de cada uma das laçadas CDR de sequência aleatória ou preparação de laçadas CDR de estruturas canónicas conhecidas (C. Chothia *et al.*, *Nature* 342 877-893, 1989) e incorporação de elementos de sequência aleatórios. A natureza de linha germinal dos segmentos V e J pode ser alterada por incorporação de alterações específicas ou aleatórias na sequência ou por utilização de regiões de gene V mutadas somaticamente. A estratégia utilizada nos Exemplos 5 a 7 tem a vantagem de as estruturas de laçada dos segmentos de gene V formarem apenas um número limitado de dobras distintas e de combinações de dobras (C. Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227 779-817, 1992) e de terem presumivelmente evoluído quanto à estabilidade e de criarem uma distribuição e uma gama de locais de ligação bem adaptados para se ajustarem à estrutura

de antigénios. Para além disso, as regiões de estrutura (*framework*) e as primeiras duas laçadas hipervariáveis de ambas as cadeias pesada e leve dos anticorpos humanos sintéticos são provavelmente idênticas em muitos indivíduos diferentes. Estes anticorpos humanos sintéticos poderão ser menos imunogénicos do que estruturas inteiramente artificiais.

Uma alternativa adicional mas menos preferida às bibliotecas de exibição em fagos naturais e sintéticas anteriores seria preparar bibliotecas de mutagénese aleatória exibidas em fago, obtidas a partir de uma ou de algumas moléculas de anticorpos humanos e seleccionar a partir destas especificidades anti-auto-antigénio.

SELECCÃO

Rgdp individuais, expressando a especificidade desejada por um antigénio, podem ser isolados a partir de uma biblioteca utilizando as técnicas de rastreio convencionais (e.g. como descrito em Harlow, E., e Lane, D., 1988, *supra* Gherardi, E. et al. 1990. *J. Immunol. Meth.* 126, 61-68).

Os requerentes idealizaram também técnicas de selecção que são praticáveis por causa das propriedades únicas dos rgdp. A ideia geral de alguns procedimentos de rastreio é ilustrada na Figura 5 utilizando pAb como um exemplo tipo de rgdp.

A população/biblioteca de pAb a ser rastreada é obtida a partir da recombinação artificial de segmentos V humanos, como aqui descrito algures. Esta população pode ser rastreada em um ou mais dos formatos depois descritos por referência à Figura 5, para obter aqueles pAb individuais cujas propriedades de ligação de antigénio são diferentes da amostra c.

Eluição de ligação

A Figura 5(i) mostra antigénio (ag) ligado a uma superfície sólida (s), a superfície sólida (s) pode ser proporcionada por uma caixa de Petri, por pérolas de cromatografia, por pérolas magnéticas e outras. A população/biblioteca de pAb é depois passada sobre o ag, e aqueles indivíduos p que se ligam ficam retidos após lavagem, e são opcionalmente detectados com o sistema de detecção d.

Pode-se utilizar um sistema de detecção baseado em anti-soros anti-fd (ver, por exemplo, Exemplo 4 de W092/01047). Se se retirarem amostras de população ligada p sob condições crescentemente rigorosas, a afinidade de ligação representada em cada amostra aumentará. Condições de rigor acrescido podem ser obtidas, por exemplo, aumentando o tempo de embebimento ou alterando o pH da solução de embebimento, etc.

Competição

Por referência à Figura 5(ii), o antigénio ag pode estar ligado a um suporte sólido s e ligado até à saturação pela molécula de ligação original c. Se uma população de pAb mutante (ou um conjunto de pAb não relacionados) for oferecida ao complexo, apenas se ligarão aqueles que possuem afinidade mais elevada pelo antigénio ag do que c. Na maioria dos exemplos, apenas uma minoria de população c será deslocada por indivíduos da população p. Se c for uma molécula de anticorpo tradicional, todo o material ligado pode ser recuperado e o p ligado recuperado por infecção de bactérias adequadas e/ou pela utilização de técnicas padrão tais como PCR.

Uma aplicação vantajosa é quando se utiliza ag como um receptor e c como o ligando correspondente. A população ligada recuperada p é depois relacionada estruturalmente com o local de ligação de receptor e/ou ligando. Este tipo de especificidade é conhecida como muito útil na indústria farmacêutica.

Outra aplicação vantajosa é quando ag é um anticorpo e c o seu antigénio. A população ligada recuperada p é então um anticorpo anti-idiotípico que tem numerosas utilizações em investigação e nas indústrias farmacêutica e de diagnóstico.

Actualmente, é difícil seleccionar directamente anticorpos anti-idiotípicos. Os pAb proporcionariam a capacidade para fazer isto directamente por ligação de bibliotecas de pAb (e.g. uma biblioteca naïve) a células B (que expressam anticorpos sobre a sua superfície) e isolamento daqueles fagos que se ligaram bem.

Nalguns casos, pode provar ser vantajoso pré-seleccionar a população p. Por exemplo, no exemplo anti-idiotípico acima, p pode ser absorvido contra um anticorpo relacionado que não se liga ao antigénio.

Contudo, se *c* for um pAb, então qualquer um de *c* e *p* ou ambos podem ser marcados vantajosamente de algum modo, para distinguir e para seleccionar o *p* ligado em relação ao *c* ligado. Esta marcação pode ser física, por exemplo, por pré-marcação de *p* com biotina; ou, mais vantajosamente, genética. Por exemplo, *c* pode estar marcado com um local de restrição EcoB, enquanto *p* pode estar marcado com um local de restrição EcoK (ver Carter, P. et al., 1985, *Nucl. Acids Res.* 13, 4431-4443). Quando *p+c* ligados são eluídos do antígeno e utilizados para infectar bactérias adequadas, existe restrição (e assim nenhum crescimento) de população *c* (i.e. EcoB a restringir bactérias neste exemplo). Qualquer fago que crescesse estaria grandemente enriquecido no que se refere àqueles indivíduos a partir de *p* com afinidades de ligação mais elevadas. Alternativamente, a marcação genética pode ser conseguida por marcação de *p* com novas sequências, que podem ser utilizadas para amplificar especificamente *p* a partir da mistura utilizando PCR.

Uma vez que os pAb ligados podem ser amplificados utilizando por exemplo PCR ou infecção bacteriana, é também possível recuperar a especificidade desejada, mesmo quando estão ligados indivíduos não suficientes para permitir a detecção via técnicas convencionais.

O método preferido para selecção de um fago exibindo uma molécula de proteína com uma especificidade ou afinidade desejadas será frequentemente a eluição a partir de uma matriz de afinidade com um ligando. Assim, auto-antígeno ou seus fragmentos podem ser utilizados para eluir anticorpos de fago específicos a partir de auto-antígeno ligado a uma matriz. Alternativamente, o antígeno homólogo de uma espécie diferente pode ser ligado a uma matriz, é ligada uma biblioteca de anticorpos de fago, e anticorpos de fago específicos para o auto-antígeno podem ser eluídos utilizando auto-antígeno. Por exemplo, um antígeno bovino pode ser ligado à matriz, é ligada uma biblioteca de anticorpos de fago humanos, e é utilizado antígeno humano para eluição. Auto-anticorpos assim isolados serão específicos para epítomos partilhados entre os antígenos bovino e humano. Uma alternativa adicional mas menos preferida pode ser ligar o fago não especificamente a uma coluna e eluir com auto-antígeno. Por exemplo, se uma biblioteca de Fab em fagos for ligada a uma coluna de afinidade anti-Fab, esta pode ser lavada a um pH que não elui fago não específico e depois

lavada com solução que é a mesma excepto que contém auto-antigénio, com eluição em virtude da afinidade mais elevada pela fase móvel de fago expressando anticorpos contra o auto-antigénio.

Para cada um destes formatos, a eluição com concentrações crescentes de ligando deverá eluir fago exibindo moléculas de ligação de afinidade crescente. No entanto, quando e.g. um pAb se liga ao seu antigénio com elevada afinidade ou avidéz (ou outra proteína ao seu parceiro de ligação), pode não ser possível eluir o pAb a partir de uma matriz de afinidade com uma molécula relacionada com o antigénio. Alternativamente, pode não existir qualquer molécula de eluição específica adequada que possa ser preparada em concentração suficientemente elevada. Nestes casos, é necessário utilizar um método de eluição que não é específico e.g. do complexo antigénio-anticorpo. Alguns dos métodos de eluição não específicos geralmente utilizados reduzem a viabilidade do fago, por exemplo, a viabilidade do fago é reduzida com o tempo a pH 12 (Rossomando, E.F. e Zinder N.D. *J. Mol. Biol.* 36, 387-399, 1968). Podem existir interacções entre e.g. anticorpos e matrizes de afinidade que não podem ser quebradas sem remover completamente a infecciosidade de fago. Nestes casos, é requerido um método para eluir fago que não se baseia na ruptura e.g. da interacção anticorpo - antigénio. Deste modo, foi idealizado um método que permite a eluição de pAb ligados sob condições moderadas (redução de um grupo ditiol com ditioneitol) que não quebra a estrutura do fago (Exemplo 47 de WO92/01047).

O método de eluição moderada utiliza a ligação da população de anticorpos de fago a antigénio biotinilado e ligação a pérolas magnéticas de estreptavidina. Após lavagem para remover fago não ligado, o anticorpo de fago é eluído e utilizado para infectar células para dar uma população seleccionada de anticorpos de fago. Uma ligação dissulfureto entre a biotina e a molécula de antigénio permite a eluição moderada com ditioneitol. Uma forma particularmente vantajosa de realizar esta selecção é utilizar antigénio biotinilado em excesso mas numa concentração igual ou inferior a uma concentração equivalente à constante de dissociação desejada para a ligação antigénio-anticorpo. Este método é vantajoso para a selecção de anticorpos de afinidade elevada (R. E. Hawkins, S.J. Russell e G. Winter *J. Mol. Biol.* 226, 889-896, 1992). Podem também ser seleccionados anticorpos para

velocidades de dissociação (*off-rates*) mais lentas para selecção de antigénio como descrito em R.E. Hawkins *et al.*, 1992 *supra*. A concentração de antigénio biotinilado pode ser gradualmente reduzida para seleccionar anticorpos de fago de afinidade mais elevada. Como alternativa, o anticorpo de fago pode estar em excesso em relação ao antigénio biotinilado de modo a que anticorpos de fago compitam pela ligação, de um modo análogo à competição de fago de péptido a anticorpo biotinilado descrita por J.K. Scott & G.P. Smith (*Science* 249, 386-390, 1990).

Este procedimento de eluição é apenas um exemplo de um procedimento de eluição sob condições moderadas. Um método particularmente vantajoso seria introduzir uma sequência de nucleótidos codificando aminoácidos constituindo um local de reconhecimento para clivagem por uma protease altamente específica entre o gene estranho inserido, neste caso um gene para um fragmento de anticorpo, e a sequência do restante de gene III. Exemplos destas proteases altamente específicas são Factor X e trombina. Após ligação do fago a uma matriz de afinidade e eluição para remover fago de ligação não específica e fago de ligação fraca, o fago ligado fortemente será removido por lavagem da coluna com protease sob condições adequadas para digestão no local de clivagem. Isto clivará o fragmento de anticorpo da partícula fágica por eluição do fago. Será de esperar que fago seja infeccioso, uma vez que o único local de protease deverá ser o introduzido especificamente. O fago de ligação forte pode então ser recuperado por infecção de células *e.g.* *E. coli* TG1.

Um procedimento alternativo ao anterior é pegar na matriz de afinidade que reteve o pAb fortemente ligado e extrair o ADN, por exemplo por ebulição em solução de SDS. O ADN extraído pode depois ser utilizado para transformar directamente células hospedeiras de *E. coli* ou, alternativamente, as sequências codificando o anticorpo podem ser amplificadas, por exemplo, utilizando PCR com iniciadores adequados tais como os aqui revelados, e depois inseridas num vector para expressão como um anticorpo solúvel para estudo adicional ou como um pAb para rondas de selecção adicionais.

Outro método preferido para selecção de acordo com a afinidade seria por ligação a uma matriz de afinidade contendo quantidades baixas de ligando.

Quando se pretende seleccionar entre uma população de fagos exibindo uma molécula de proteína com uma afinidade elevada pelo seu ligando, uma estratégia preferida é ligar uma população de fago a uma matriz de afinidade que contém uma quantidade baixa de ligando. Existe competição entre fagos, exibindo proteínas de elevada afinidade e de baixa afinidade, pela ligação ao ligando na matriz. Fago exibindo proteína de afinidade elevada é preferencialmente ligado e a proteína de afinidade baixa é removida por lavagem. A proteína de elevada afinidade é depois recuperada por eluição com o ligando ou por outros procedimentos que eluem o fago a partir da matriz de afinidade (o Exemplo 35 de WO92/01047 demonstra este procedimento).

Resumindo, para recuperação do ADN empacotado a partir do passo de afinidade, o pacote pode ser simplesmente eluído, pode ser eluído na presença de um membro de sbp homólogo que compete com o referido pacote pela ligação a um membro de sbp complementar; pode ser removido por ebulição, pode ser removido por clivagem proteolítica da proteína; e outros métodos serão evidentes para os peritos na especialidade e.g. destruição da ligação entre o substrato e o membro de sbp complementar para libertar o referido ADN empacotado e o membro de sbp. Em qualquer proporção, o objectivo é obter o ADN a partir do pacote tal que este possa ser utilizado, directamente ou indirectamente, para expressar o membro de sbp codificado desse modo.

A eficiência deste procedimento de selecção para pAb e a capacidade para criar bibliotecas muito grandes significa que as técnicas de imunização desenvolvidas, para aumentar a proporção de células rastreadas produzindo anticorpos de interesse, não serão um requisito absoluto. A técnica permite o rápido isolamento de especificidades de ligação e.g. especificidades de ligação de antigénio, incluindo aquelas que seriam difíceis ou mesmo impossíveis de obter por técnicas convencionais, por exemplo, anticorpos catalíticos ou anti-idiotípicos. A remoção total do animal é agora possível, uma vez construída uma biblioteca completa do repertório imunitário.

Aplicações de anticorpos para auto-antigénios

Anticorpos humanos para componentes da superfície celular. O isolamento destas especificidades de anticorpo

seria particularmente útil para a preparação de agentes que medeiam a morte celular, por exemplo, de células de cancro, por exemplo utilizando a função efectora natural de anticorpos. Auto-anticorpos podem também ser valiosos na preparação de reagentes de diagnóstico de imagiologia *in vivo*, por exemplo utilizando radioisótopos.

Anticorpos dirigidos contra componentes da superfície celular de subconjuntos de células T específicas podem ser utilizados terapêuticamente (D. Wraith *et al.*, *Cell* 57 709-715, 1989; L. Steinman e R. Mantegazza *FASEB J.* 4 2726-2731, 1990), por exemplo, para prevenir a acção de células T causadora de artrite reumatóide.

Anticorpos humanos modificadores da função de moléculas próprias

Podem ser isolados anticorpos que modificam a acção de moléculas próprias tais como hormonas, factores de crescimento e receptores através da sua ligação a um epítopo específico na molécula. Proteínas multifuncionais podem ter ambas as características desejáveis e indesejáveis, particularmente se forem utilizadas terapêuticamente. Por exemplo, a linfoquina TNF (factor de necrose tumoral) liga-se pelo menos a duas classes diferentes de receptores celulares - um habitualmente encontrado em células endoteliais vasculares, o outro habitualmente encontrado em células de tumor. Foi preparado um anticorpo de ratinho contra TNF que impede o TNF de se ligar a receptores em células endoteliais embora permita ainda que este se ligue a células de tumor, permitindo assim o ataque aos tumores sem efeitos tóxicos mediados através de células endoteliais (Pedido de Patente PCT/AU90/00337). Para utilização terapêutica de modificadores de anticorpo de moléculas de hormona ou de factor de crescimento, seria preferível ter uma especificidade de anticorpo humano isolada directamente por selecção a partir de uma biblioteca de fago.

Anti-idiotípicos humanos

Anticorpos anti-idiotípicos (anticorpos dirigidos contra os locais de combinação de antigénio formados pelos domínios variáveis de anticorpos humanos) são produzidos convencionalmente por isolamento de um anticorpo contra um antigénio e depois utilização deste anticorpo isolado como um imunogénio para desenvolver anticorpos dirigidos contra si. Se

o anticorpo original é dirigido contra uma hormona ou factor de crescimento, o relacionamento entre antigénio e locais de combinação de anticorpo significa que o anti-idiotípico pode mimetizar nalguns aspectos a hormona ou factor de crescimento e ligar-se ao receptor para estas moléculas. Contudo, será de esperar que a fracção de anticorpos anti-idiotípicos, capazes de mimetizar a ligação da hormona ao receptor, seja pequena. Adicionalmente, a deleção de linfócitos anti-próprios significaria que a utilização da via convencional para anti-idiotípicos seria difícil para o isolamento de anticorpos anti-idiotípicos humanos mimetizando moléculas de ligação a receptores humanos. Neste pedido de patente, mostramos que anticorpos dirigidos contra os locais de combinação de antigénio, formados pelos domínios variáveis de anticorpos humanos, podem ser directamente isolados a partir de bibliotecas de exibição de anticorpo de fago, como se mostra nos Exemplos 1 e 4, e deverá também ser possível identificar os anticorpos anti-idiotípicos, mimetizando a ligação da hormona, directamente por rastreio quanto à ligação ao receptor.

Anti-idiotípicos podem também ser úteis para o tratamento de doenças auto-imunes. Estes podem ser utilizados para se ligarem a auto-anticorpos em circulação. Contudo, pode ser preferível atacar directamente as células produtoras de anticorpos, por exemplo utilizando um anticorpo biespecífico dirigido contra um marcador da superfície celular, bem como uma especificidade anti-idiotípica. Alternativamente, pode-se utilizar plasmaferese para remover anticorpo em circulação e as células tratadas directamente.

Anticorpos humanos contra receptores

Anticorpos humanos que se ligam a receptores, bloqueando ou antagonizando a função de ligando, podem ser seleccionados directamente a partir de uma biblioteca de fago exibindo anticorpos obtida a partir de um dador não imunizado.

Anticorpos humanos para prevenir a rejeição de transplante

Anticorpos dirigidos contra as proteínas do complexo de histocompatibilidade principal podem ser utilizados para tratar pacientes após transplantes, ou órgãos antes da transplantação, de modo a prevenir a rejeição. Anticorpos dirigidos contra vários marcadores da superfície celular de

linfócitos têm sido utilizados para a prevenção de rejeição em transplantes e.g. CD45, CD3, CD4, CD8 e receptor de interleucina-2. O Exemplo 3 mostra que anticorpos humanos contra CD4 podem ser isolados directamente a partir de bibliotecas de exibição em fagos.

Anticorpos humanos contra citoquinas

Anticorpos humanos contra citoquinas seriam valiosos para tratamento de doença humana, por exemplo de choque séptico com anticorpos anti-TNF e anti-interleucina-1. Os Exemplos 1 e 6 mostram que anticorpos humanos contra TNF podem ser isolados directamente de bibliotecas de anticorpos de fago obtidas a partir de humanos não imunizados ou pela recombinação sintética de fragmentos V, D e J. Em muitos casos, estas moléculas de citoquina são fortemente conservadas entre espécies, por exemplo, o factor de crescimento transformante- β (TGF- β), e tem sido difícil isolar anticorpos dirigidos contra a molécula humana mesmo em ratinhos. O isolamento de auto-anticorpos humanos como descrito neste invento proporciona um método de obtenção de anticorpos humanos com uma tal especificidade.

Anticorpos humanos para diagnóstico e tratamento de perturbações cardíacas

Anticorpos humanos contra componentes de coágulo e.g. fibrina, seriam úteis para a imagiologia de coágulos quando marcados com radioactividade ou para dissolução de coágulos, por exemplo, se ligados a uma enzima de dissolução de coágulo tal como uroquinase.

Anticorpos que desencadeiam uma função de receptor

Podem-se seleccionar anticorpos que se ligam a um receptor celular e desencadeiam uma resposta biológica na célula. Isto é a seguir descrito em mais detalhe e no Exemplo 8 descreve-se o isolamento destes anticorpos.

Por ciclos de crescimento e selecção, são isolados aqueles rgdp que se ligam aos receptores celulares. Alguns destes rgdp codificam especificidades de ligação com o potencial (sozinhas ou em combinação com outras especificidades de ligação) para activar os receptores. Estas

especificidades de ligação são testadas sozinhas, ou em combinação, quanto à activação dos receptores celulares.

Existe uma variedade de receptores celulares nos quais a ligação de um ligando, por exemplo hormona, factor de crescimento ou péptido, desencadeia um evento biológico, por exemplo, a activação de actividade de tirosina-quinase ou a abertura de um canal de iões. Os rgdp podem ser seleccionados quanto à ligação ao receptor celular (ou a um receptor relacionado com porções de superfície conservadas, tais como as de outra espécie), por exemplo utilizando células exibindo o receptor celular, ou utilizando um receptor solúvel imobilizado sobre uma fase sólida, ou utilizando domínios ou epítomos de péptido do receptor. Idealmente, o receptor seria proporcionado numa forma ligada de modo cruzado (como requerido para a sua activação).

A activação de receptores na superfície celular parece envolver frequentemente o movimento relativo de proteínas ou subunidades. Por exemplo, nos receptores vedados por neurotransmissores, as cinco subunidades que estão dispostas simetricamente no local da membrana, definem um percurso de iões para o centro. Pensa-se que a ligação do neurotransmissor altera o tamanho do canal de iões central provocando pequenos rearranjos entre as subunidades numa transição alostérica. Para receptores de tirosina-quinase, o ligando parece conduzir a oligomerização do receptor. Assim, anticorpos com especificidades de ligação dirigidos contra um receptor podem ter o potencial para promover uma alteração alostérica ou para promover a oligomerização. A oligomerização dos receptores pode também ser promovida utilizando anticorpos bivalentes ou biespecíficos.

Os anticorpos solúveis ou fragmentos de anticorpo podem ser fragmentos monovalentes, por exemplo, fragmentos Fv de cadeia simples ou fragmentos Fab, ou fragmentos bivalentes, por exemplo, Fab₂ ou fragmentos de anticorpo completos. A bivalência pode também ser promovida doutros modos, por exemplo por (1) codificação de uma marca (*tag*), tal como um péptido ou proteína (por exemplo, a subunidade de uma proteína dimérica) que se auto-associa, no terminal N ou C do fragmento monomérico, (2) utilização de um anticorpo bivalente que se liga ao fragmento monovalente, por exemplo, a uma marca C-terminal comum, ou a um domínio constante de anticorpo, ou (3) ligação química cruzada.

Anticorpos biespecíficos ou fragmentos biespecíficos podem também ser preparados tal como para os fragmentos bivalentes. (Para expressão do anticorpo ou fragmento na mesma célula, será necessário introduzir em conjunto os genes codificando ambas as especificidades). Os diferentes "braços" de anticorpo podem ser dirigidos contra o mesmo receptor, por exemplo a diferentes epítomos, ou contra dois receptores diferentes (para activar receptores híbridos).

O isolamento directo de auto-anticorpos a partir de bibliotecas de fago como descrito neste invento é importante para permitir que um grande número de anticorpos seja pesquisado quanto à activação destes receptores.

É apropriado distinguir a produção de anticorpos para activar receptores, como é aqui descrito e proporcionado como um aspecto do presente invento, da "via anti-idiotípica" na qual anticorpos específicos desenvolvidos num animal, incluindo um humano, por vacinação do referido animal com um antigénio específico, são eles próprios utilizados para vacinar outro animal, sendo produzidos novos anticorpos denominados anticorpos anti-idiotípicos (Anti-Id) capazes de reconhecerem e de se ligarem ao primeiro conjunto de anticorpos. Algumas espécies destes Anti-Id são capazes de mimetizar as propriedades biológicas específicas do antigénio original. Por exemplo, se o antigénio fosse uma hormona de péptido ou um receptor celular, o Anti-Id para o antigénio de hormona ou receptor celular é capaz de induzir uma resposta da célula (ver Gaulton, G.N. e Greane, M.I., 1986. "Idiotypic mimicry of biological receptors". *Ann. Rev. Immunol.* 4, 253-280; Sege, K. e Peterson, P.A., 1978. "Use of anti-idiotypic antibodies as cell surface receptor probes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 2443-2447 para exemplos).

A essência do corrente ensinamento de Anti-Id como miméticos de antígenos é que estes são produzidos como resultado de se construírem anticorpos contra anticorpos do antigénio original. No entanto, existe alguma controvérsia sobre se estes anti-idiotípicos mimetizam com exactidão o antigénio original (S. J. Davis et al., *Nature* 358 76-79, 1992).

Deste modo, existe uma distinção clara entre anticorpos preparados por uma via anti-idiotípica que mimetizam antígenos tais como factores de crescimento ou hormonas, e

anticorpos que são produzidos directamente contra os receptores para activar os receptores. Os anticorpos obtidos por uma via anti-idiotípica requerem o antigénio (hormona, factor de crescimento) e ligar-se-ão ao mesmo epítopo no receptor que a hormona, enquanto os anticorpos obtidos por ligação aos receptores não necessitam de se ligar ao mesmo epítopo para activar o receptor. De facto, estes anticorpos não necessitam de mimetizar uma hormona ou factor de crescimento conhecidos, uma vez que a sua especificidade, ou ligação ao receptor (caracterizado como epítopo, velocidade de associação ou velocidade de dissociação) ou a depuração do sangue serão provavelmente diferentes. O processo para produção dos anticorpos é também bastante diferente. Os anticorpos anti-idiotípicos são produzidos de modo clássico por imunização de animais, ainda que estes possam também ser isolados directamente a partir de bibliotecas de exibição em fagos como acima descrito. Anticorpos dirigidos contra auto-receptores são produzidos por selecção a partir de bibliotecas de gene V (como acima descrito).

Para além das vantagens em relação à via anti-idiotípica, os anticorpos obtidos directamente por ligação de receptor podem ainda ter vantagens em relação à hormona ou ao factor de crescimento naturais. Assim, receptores que são deficientes na ligação da hormona ou do factor de crescimento naturais (por exemplo numa doença genética), podem ser activados por um anticorpo que se liga a um epítopo diferente.

Como agentes terapêuticos, os vários isotipos de anticorpos ou fragmentos de anticorpos, transportando as regiões variáveis responsáveis pela especificidade da molécula, têm várias propriedades com vantagens em relação à porção bioactiva que mimetizam. Por exemplo, ao contrário das hormonas naturais, a sua meia-vida na circulação pode ser modificada facilmente. Dependendo do isotipo de anticorpo ou fragmento escolhido, estes podem ter meias-vidas em circulação num paciente na gama de minutos a várias semanas. Se a utilização prolongada ou a depuração num curto prazo for requerida isto pode ser facilmente acomodado escolhendo o isotipo de anticorpo apropriado, sem necessidade de utilizar dispositivos de libertação retardada tais como implantes, ou perfusão intravenosa contínua, etc.

Adicionalmente, muitas hormonas ou factores de crescimento de tecido ou antigénios em geral são

funcionalmente complexos com diferentes epítomos de cada uma das moléculas possuindo várias funções específicas. Miméticos de clones de anticorpo são monofuncionais em relação a este aspecto pelo que podem ser utilizados para produzir um efeito biológico específico de uma hormona sem um segundo efeito, efeito último este que pode ser desvantajoso para o paciente. Assim, o TNF de linfoquina (factor de necrose de tumor) liga-se a duas classes diferentes de receptores celulares - um comum às células endoteliais vasculares, o outro comum às células de tumor. Se o TNF for modificado, tal que não se possa ligar aos receptores de células endoteliais mas que se possa ainda ligar a receptores de células de tumor, os tumores são atacados sem ao mesmo tempo induzir os efeitos colaterais muito tóxicos mediados através dos receptores vasculares. (Isto é descrito no Pedido de Patente Australiana PCT/AU90/00337). Será de esperar que um mimético de anticorpo, capaz de reconhecer o receptor de células de tumor, seja muito específico e mate células de tumor, sem induzir efeitos colaterais tóxicos mediados através do endotélio vascular, uma vez que este não terá qualquer semelhança com o epítomo de TNF que se liga a receptores neste último.

TERMINOLOGIA

Muita de terminologia descrita nesta secção foi mencionada no texto onde apropriado.

Auto

Um auto-antigénio é um antigénio ou epítomo que é capaz de se ligar a um local de ligação ao antigénio formado por domínio(s) variável(eis) de anticorpo e que é conservado entre membros de uma espécie de animal e nativo para o corpo.

O sistema imunitário tenta evitar produzir anticorpos para auto-antigénios. Tem sido sugerido que (i) sequências de segmentos de gene V de linha germinal evoluem sob pressão para serem dirigidas contra antigénios e epítomos estranhos, e.g. patogénicos, e não no sentido de serem capazes de proporcionar anticorpos que se ligarão a auto-antigénios, e que, (ii) para além disto, a tolerância imunitária faz com que aquelas combinações de segmentos de gene codificando auto-anticorpos que surgem, sejam eliminadas ou anergizadas. Consequentemente, não existem normalmente na circulação anticorpos contra estes antigénios excepto em estados de doença, e.g. doenças auto-imunes. Um auto-antigénio pode ser um que não varia entre

indivíduos de uma espécie. Um auto-antigénio pode ser um para o qual existe variação alélica normal através da população. Não será de esperar normalmente que a imunização de um indivíduo numa espécie com um auto-antigénio resulte na geração, ou detecção, de anticorpos para o antigénio, excepto talvez quando tolerância é deliberadamente quebrada. Anticorpos para um auto-antigénio apenas podem estar presentes num indivíduo que está a sofrer de uma doença auto-imune. Por outro lado, existem alguns auto-antigénios para os quais podem ser encontrados anticorpos em circulação numa subpopulação de indivíduos normais de uma espécie.

Um auto-antigénio pode ser um antigénio reconhecido por anticorpos na superfície de células B mas não por anticorpos que podem ser encontrados em circulação. Pode não ser possível detectar ou obter anticorpos em circulação para um auto-antigénio excepto talvez quando o indivíduo está a sofrer de uma doença ou síndrome auto-imune.

Um auto-anticorpo ou fragmento de anticorpo é um anticorpo ou um seu fragmento que possui especificidade de ligação por um auto-antigénio. Pode reconhecer um epítipo que apenas é encontrado num auto-antigénio, ou pode ser reactivo de modo cruzado com um antigénio que indivíduos da espécie reconhecerão como estranho. O presente invento é particularmente bem adequado para a produção e isolamento de fragmentos de anticorpo que apenas se ligam a um auto-antigénio.

Par de ligação específica

Descreve um par de moléculas (cada uma sendo um membro de um par de ligação específica) que são obtidas naturalmente ou produzidas sinteticamente. Uma do par de moléculas, possui uma área na sua superfície, ou uma cavidade que se liga especificamente a, e é deste modo definida como complementar com, uma organização espacial e polar particular da outra molécula, tal que o par tem a propriedade de se ligar especificamente ao outro. Exemplos de tipos de pares de ligação específica são antigénio-anticorpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-substrato, IgG-proteína A.

Membro multimérico

Descreve um primeiro polipéptido que se associará com pelo menos um segundo polipéptido, quando os polipéptidos são expressos em forma livre e/ou expressos sobre a superfície de um substrato. O substrato pode ser proporcionado por um bacteriófago. Quando existem dois polipéptidos associados, o complexo de polipéptidos associados é um dímero, quando existem três, um trímero etc. O dímero, trímero, multímero etc. ou o membro multimérico podem compreender um membro de um par de ligação específica.

Exemplos de membros multiméricos são domínios pesados baseados numa molécula de imunoglobulina, domínios leves baseados numa molécula de imunoglobulina, subunidades de receptor de célula T.

Pacote de exibição genética replicável (rgdp)

Descreve uma partícula biológica que tem informação genética conferindo à partícula a capacidade de se replicar. A partícula pode exibir sobre a sua superfície pelo menos parte de um polipéptido. O polipéptido pode ser codificado por informação genética nativa da partícula e/ou colocada artificialmente na partícula ou num seu antepassado. O polipéptido exibido pode ser qualquer membro de um par de ligação específica e.g. domínios de cadeia pesada ou leve baseados numa molécula de imunoglobulina, uma enzima ou um receptor etc.

No contexto do presente invento a partícula é um bacteriófago filamentoso tal como fd ou M13.

Pacote

Descreve um pacote de exibição genética replicável no qual a partícula exibe um membro de um par de ligação específica na sua superfície. O pacote pode ser um bacteriófago que exibe um domínio de ligação de antigénio na sua superfície. Este tipo de pacote foi denominado por anticorpo de fago (pAb).

Anticorpo

Descreve uma imunoglobulina quer natural quer produzida parcial ou totalmente de modo sintético. O termo abrange

também qualquer proteína possuindo um domínio de ligação que é, ou é homólogo de, um domínio de ligação de imunoglobulina. Estas proteínas podem ser obtidas a partir de fontes naturais, ou produzidas parcial ou totalmente de modo sintético.

Exemplos de anticorpos são os isotipos de imunoglobulina e os fragmentos Fab, F(ab¹)₂, scFv, Fv, dAb, Fd.

Superfamília de imunoglobulina

Descreve uma família de polipéptidos, cujos membros têm pelo menos um domínio com uma estrutura relacionada com a estrutura do domínio variável ou constante de moléculas de imunoglobulina. O domínio contém duas folhas β e usualmente uma ligação dissulfureto conservada (ver A.F. Williams e A.N. Barclay, 1988, *Ann. Rev. Immunol.* 6, 381-405).

Exemplos de membros de uma superfamília de imunoglobulina são CD4, receptor de factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), molécula de adesão intercelular (ICAM). Excepto onde o contexto o ditar de outro modo, a referência neste pedido de patente a imunoglobulinas e a homólogos de imunoglobulina inclui membros da superfamília de imunoglobulina e seus homólogos.

Homólogos

Este termo indica polipéptidos possuindo os mesmos resíduos ou resíduos conservados numa posição correspondente na sua estrutura primária, secundária ou terciária. O termo estende-se também a duas ou mais sequências de nucleótidos codificando os polipéptidos homólogos.

Exemplos de péptidos homólogos são os isotipos de imunoglobulina e as enzimas *TIM barrel*.

Funcional

Em relação a um membro de sbp exibido sobre a superfície de um rgdp, significa que o membro de sbp é apresentado numa forma dobrada na qual o seu domínio de ligação específica pelo seu membro de sbp complementar é o mesmo ou aproximadamente análogo à sua configuração nativa, pelo que este exhibe especificidade similar em relação ao membro de sbp complementar.

População geneticamente diversificada

Em relação a membros de sbp ou seus componentes de polipéptido, isto refere-se não apenas à diversidade que pode existir na população natural de células ou organismos, mas também a diversidade que pode ser criada por mutação artificial *in vitro* ou *in vivo*.

A mutação *in vitro* pode envolver, por exemplo, mutagénese aleatória utilizando oligonucleótidos possuindo mutações aleatórias da sequência que se deseja fazer variar. A mutagénese *in vivo*, por exemplo, pode utilizar estirpes mutadoras de microrganismos hospedeiros para alojar o ADN (ver Exemplo 38 da WO 92/01047). As palavras "população única" podem ser utilizadas para designar uma pluralidade de e.g. cadeias polipeptídicas que não são geneticamente diversificadas, i.e. são todas a mesma. Uma população restringida é uma que é diversa mas menos do que o repertório completo de um animal ou de uma biblioteca, sintética ou não. A diversidade pode ter sido reduzida por selecção prévia, e.g. utilizando especificidade de ligação de antigénio.

Domínio

Um domínio é uma parte de uma proteína que está dobrada sobre ela própria e independentemente das outras partes da mesma proteína e independentemente de um membro de ligação complementar. Uma unidade dobrada é uma combinação específica de uma estrutura de hélice α e/ou folha β . Domínios e unidades dobradas contêm estruturas que juntam aminoácidos que não estão adjacentes na estrutura primária.

Forma livre

Descreve o estado de um polipéptido que não é exibido por um pacote de exibição genética replicável.

Deficiente condicionalmente

Descreve um gene que expressa um polipéptido deficiente sob um conjunto de condições, mas que expressa um polipéptido não deficiente, mas relacionado, diferente, sob outro conjunto de condições. Um exemplo é um gene contendo uma mutação âmbar em hospedeiros não supressores ou supressores, respectivamente.

Alternativamente, um gene pode expressar uma proteína que é deficiente sob um conjunto de condições, mas não sob outro conjunto de condições. Um exemplo é um gene com uma mutação sensível à temperatura.

Codão de paragem de tradução suprimível

Descreve um codão que permite a tradução de sequências de nucleótidos a jusante do codão sob um conjunto de condições, mas sob outro conjunto de condições a tradução pára no codão. Exemplos de codões de paragem de tradução suprimíveis são os codões âmbar, ocre e opalino.

Estirpe mutadora

É uma célula hospedeira que possui um defeito genético que faz com que o ADN replicado nesta esteja mutado em relação ao seu ADN original. Exemplos de estirpes mutadoras são NR9046mutD5 e NR9046 mut T1 (ver Exemplo 38 da WO92/01047).

Fago auxiliar

É um fago que é utilizado para infectar células contendo um genoma de fago deficiente e que funciona para complementar o defeito. O genoma de fago deficiente pode ser um fagemídeo ou um fago com sequências de gene codificando alguma função removidas. Exemplos de fagos auxiliares são M13K07, M13K07 gene III no. 3; e fago exibindo ou codificando uma molécula de ligação fundida a uma proteína da cápside.

Vector

É uma molécula de ADN capaz de replicação num organismo hospedeiro, no qual um gene é inserido para construir uma molécula de ADN recombinante.

Vector de fago

É um vector obtido por modificação de um genoma de fago, contendo uma origem de replicação para um bacteriófago, mas não para um plasmídeo.

Vector de fagemídeo

É um vector obtido por modificação de um genoma de plasmídeo, contendo uma origem de replicação para um bacteriófago bem como a origem de replicação de plasmídeo.

Segregado

Descreve um rgdp ou molécula que se associa com o membro de um sbp exibido no rgdp, em que o membro de sbp e/ou a molécula foram dobrados e o pacote montado externamente ao citosol celular.

Reportório de genes de imunoglobulina rearranjados

Uma colecção de nucleótidos de ocorrência natural e.g. sequências de ADN que codificavam genes de imunoglobulina expressos num animal. As sequências são geradas pelo rearranjo *in vivo* de e.g. segmentos V, D e J para cadeias H e e.g. os segmentos V e J para cadeias L. Alternativamente, as sequências podem ser geradas a partir de uma linha de células imunizada *in vitro* e na qual, em resposta a imunização, o rearranjo ocorre intracelularmente.

Biblioteca

Uma colecção de nucleótidos e.g. sequências de ADN dentro de clones; ou uma colecção de polipéptidos geneticamente diversificada, ou membros de par de ligação específica, ou polipéptidos ou membros de sbp que são exibidos em rgdp susceptíveis de serem seleccionados ou rastreados para proporcionar um polipéptido ou membro de sbp individual ou uma população mista de polipéptidos ou membros de sbp.

Reportório de genes de imunoglobulina rearranjados artificialmente

Uma colecção de nucleótidos e.g. sequências de ADN obtidas total ou parcialmente a partir de uma outra fonte que não as sequências de imunoglobulina rearranjadas de um animal. Isto pode incluir, por exemplo, sequências de ADN codificando domínios VH por combinação de segmentos V não rearranjados com segmentos D e J e sequências de ADN codificando domínios VL por combinação de segmentos V e J.

Parte ou a totalidade das sequências de ADN podem ser obtidas por síntese de oligonucleótido.

Péptido líder secretor

É uma sequência de aminoácidos unida à extremidade N-terminal de um polipéptido e que dirige o movimento do polipéptido para fora do citosol.

Eluente

É uma solução utilizada para quebrar a ligação entre duas moléculas. A ligação pode ser uma ligação não covalente ou covalente. As duas moléculas podem ser membros de um sbp.

Derivado

É um polipéptido que é derivado de outro polipéptido que é codificado pelo ADN num rgdp seleccionado. O polipéptido derivado pode diferir do polipéptido codificado pela adição, deleção, substituição ou inserção de aminoácidos, ou pela ligação doutras moléculas ao polipéptido codificado. Estas alterações podem ser efectuadas ao nível do nucleótido ou da proteína. Por exemplo, o polipéptido codificado pode ser um fragmento Fab que é depois ligado a uma cauda Fc de outra fonte. Alternativamente, marcadores tais como enzimas, fluoresceínas etc. podem ser ligados a e.g. fragmentos Fab, scFv.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra uma análise por ELISA das especificidades de Fv de cadeia simples solúveis (scFv) isoladas a partir da biblioteca não imunizada por selecção em tiroglobulina bovina (painel de superior), TNF α humano (painel central) ou o mAb humano Fog-1 (gama-1, capa). A ligação foi determinada por ELISA para um painel de proteínas, como se segue: 1 - plástico; 2 - inibidor de tripsina de ovo de galinha; 3 - quimotripsinogénio A; 4 - ovalbumina de ovo de galinha; 5 - hemocianina de lapa *Fissurella*; 6 - tiroglobulina bovina; 7 - TNF α humano; 8 - lisozima de clara de ovo de peru; 9 - citocromo c de coração de cavalo; 10 - albumina de soro bovino; 11 - mAb Fog-1.

A Figura 2 mostra uma análise por ELISA das especificidades de scFv solúveis isoladas a partir da biblioteca não imunizada por selecção em antigénio carcinoembrionário (CEA) humano (painel superior), o péptido MUC1 (Price *et al.*, 1990, *supra*) (painel central) ou CD4 humano (painel inferior). A ligação foi determinada por ELISA para um painel de proteínas, como se segue: 1 - inibidor de tripsina de ovo de galinha; 2 - quimotripsinogénio A; 3 - ovalbumina de ovo de galinha; 4 - hemocianina de lapa *Fissurella*; 5 - CEA; 6 - extracto de urina contendo mucina

epitelial polimórfica (PEM) humana; 7 - tiroglobulina bovina; 8 - lisozima de clara de ovo de galinha; 9 - albumina de soro bovino; 10 - globulina gama de galinha acoplada a ácido 4-hidroxi-3-nitrofenilacético; 11 - CD4 solúvel recombinante humano.

A Figura 3 mostra um ELISA para ensaiar a ligação de três scFv, isolados por selecção num anticorpo monoclonal humano Fog-1 (IgG1, capa), para um painel de anticorpos humanos de isotipo variável, como se segue: 1 - Fog-1; 2 - o fragmento Fv de Hulys11; 3 - anticorpo Hulys11 (IgG1, capa); 4 - RegA (IgG1, capa); FogC (IgG3, capa); 6 - Pag1 (IgG1, lambda); 7 - anticorpo IgG2, lambda purificado a partir de plasma de mieloma (Sigma); 8 - Oak3 (IgG3, lambda); 9 - IgG4, lambda purificado a partir de plasma de mieloma (Sigma); 10 - Fom1 (IgM, lambda); 11 - FomA (IgM, lambda).

A Figura 4 ilustra a montagem de genes V_H na criação de uma biblioteca sintética.

A Figura 5 mostra esquematicamente técnicas de selecção para pAb: 2(i) mostra um sistema de ligação/eluição; 2(ii) mostra um sistema de competição (p = pAb; ag = antigénio ao qual a ligação por pAb é requerida; c = população de competidor e.g. anticorpo, pAb, ligando; s = substrato (e.g. pérolas de plástico etc.)); d = sistema de detecção).

O presente invento é ilustrado pelos exemplos seguintes. Iniciadores e sondas de oligonucleótido mencionados no texto estão listados na Tabela IV. As Tabelas I a IV encontram-se após o Exemplo 8.

Os Exemplos 1-4 e 8 são exemplos de referências e não estão no âmbito das reivindicações.

O Exemplo 1 mostra o isolamento de anticorpos dirigidos contra factor- α de necrose de tumor de humano e um anticorpo monoclonal de humano a partir de uma biblioteca de fago de fragmentos Fv de cadeia simples obtida a partir de um humano não imunizado.

O Exemplo 2 mostra o isolamento de anticorpos ligando-se a tiroglobulina humana a partir de uma biblioteca de fago de fragmentos Fv de cadeia simples obtida a partir de um humano não imunizado.

O Exemplo 3 mostra o isolamento de fragmentos de anticorpo dirigidos contra os auto-antígenos mucina MUC1, antígeno carcinoembrionário (CEA) e CD4 solúvel recombinante (rsCD4) a partir de uma biblioteca de exibição em fagos de fragmentos Fv de cadeia simples obtida a partir de um humano não imunizado.

O Exemplo 4 mostra a caracterização adicional de fragmentos de auto-anticorpo seleccionados por sequenciação de ADN e determinações de afinidade.

O Exemplo 5 mostra a criação de uma biblioteca humana sintética utilizando segmentos VH de linha germinal.

O Exemplo 6 mostra o isolamento de um fragmento de anticorpo ligando-se a factor- α de necrose de tumor de humano a partir de uma biblioteca sintética de linha germinal humana.

O Exemplo 7 mostra a criação de uma biblioteca humana sintética utilizando segmentos VH de linha germinal humana contendo sequências CDR3 VH de diferentes comprimentos e isolamento de fragmentos Fv de cadeia simples ligando-se a tiroglobulina humana e a um anticorpo monoclonal humano.

O Exemplo 8 mostra o isolamento de anticorpos humanos dirigidos contra moléculas de receptor de interleucina-1 de humano que activam a função de receptor.

Exemplo 1

Isolamento de fragmentos de anticorpo dirigidos contra auto-antígenos a partir de uma biblioteca de scFv produzidos a partir de dadores de sangue não imunizados

Genes V de ocorrência natural isolados a partir de PBL humanos podem ser construídos numa grande biblioteca de fragmentos de anticorpo que contêm reactividades contra antígenos aos quais o dador não foi exposto (W092/01047 Exemplo 42). Apercebemo-nos que estas bibliotecas podem também conter reactividades contra auto-antígenos, que surgem quer a partir de células B auto-reactivas que não foram eliminadas quer como fragmentos não de ocorrência natural resultantes de recombinação de cadeias VH e VL. Para testar isto, seleccionámos (*panned*) uma grande biblioteca de scFv humano

exibida sobre a superfície de um fagemídeo contra TNF- α humano e uma imunoglobulina IgG/k humana.

Métodos

Recuperação da biblioteca:

A biblioteca de scFv foi construída a partir de ARN de PBL humanos e tinha sido anteriormente descrita (W092/01047 Exemplo 42). Para recuperar fago exibindo fragmentos de anticorpo, utilizaram-se aproximadamente 10^9 *E. coli* alojando o fagemídeo para inocular 50 ml de 2 x TY contendo 1% de glucose e 100 mg/ml de ampicilina (2 x TY-AMP-GLU) e cultivaram-se até uma O.D. de 0,8 com agitação. Utilizaram-se 5 ml desta cultura para inocular 50 ml de 2 x TY-AMP-GLU, adicionaram-se 2×10^8 TU de delta gene 3 auxiliar (M13 D gene III ver W092/01047) e incubou-se a cultura a 37°C durante 45 minutos sem agitação e depois a 37°C durante 45 minutos com agitação. A cultura foi centrifugada a 4000 r.p.m. durante 10 min e ressuspendeu-se o sedimento em 2 litros de 2 x TY contendo 100 mg/ml de ampicilina e 50 mg/ml de canamicina e cultivou-se de um dia para o outro. Prepararam-se fagos como anteriormente descrito (W092/01047 Exemplo 42). O M13 D gene III foi preparado como se segue:

Fago auxiliar M13 D gene III não codifica proteína de gene III, e por isso o fago(fagemídeo) exibindo fragmentos de anticorpo tem uma maior avidez de ligação a antigénio. Partículas de M13 D gene III infecciosas são produzidas por desenvolvimento do fago auxiliar em células alojando um derivado de pUC19 fornecendo a proteína gIII do tipo selvagem durante a morfogénese de fago. Incubou-se a cultura durante 1 hora a 37°C sem agitação e depois durante mais uma hora a 37°C com agitação. Sedimentaram-se as células por centrifugação (IEC-Centra 8, 4000 rev/min durante 10 min), ressuspenderam-se em 300 ml de caldo 2 x TY contendo 100 mg ampicilina/ml e 25 mg de canamicina/ml (2 x TY-AMP-KAN) e cultivou-se de um dia para o outro, agitando a 37°C. Purificaram-se as partículas de fago e concentraram-se a partir do meio de cultura por duas precipitações com PEG (Sambrook et al., 1990), ressuspenderam-se em 2 ml de PBS e fizeram-se passar através de um filtro de 0,45 mm (Minisart NML; Sartorius) para dar uma concentração final de aproximadamente 10^{13} unidades de transdução/ml (clones resistentes à ampicilina).

Seleccção (panning) da biblioteca:

Imunotubos (Nunc) foram revestidos de um dia para o outro em PBS com 4 ml de TNF- α humano recombinante em PBS quer 100 mg/ml quer 10 mg/ml ou com 4 ml de Fog-1 10 mg/ml, uma imunoglobulina IgG/k humana que reconhece o antígeno Rh (D) de glóbulos vermelhos humanos. Bloquearam-se os tubos com 2% de Marvel-PBS durante 2 horas a 37°C e depois lavaram-se 3 vezes em PBS. Aplicaram-se ao tubo aproximadamente 10¹³ TU de fago e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente virando os tubos numa plataforma giratória para cima e para baixo e depois deixaram-se em repouso durante mais 1,5 horas. Lavaram-se os tubos 10 vezes com PBS 0,1% de Tween-20 e 10 vezes com PBS. Os fagos foram eluídos por adição de 1 ml de trietilamina 100 mM e rotação durante 15 minutos numa plataforma giratória para cima e para baixo, após o que a solução foi imediatamente neutralizada com 0,5 ml de Tris-HCl 1,0 M, pH 7,4. Utilizou-se depois o fago para infectar 10 ml de *E. coli* TG1 na fase semi-log por incubação do fago eluído com bactérias durante 30 minutos a 37°C. Os *E. coli* foram depois plaqueados sobre placas TYE contendo 1% de glucose e 100 mg/ml de ampicilina. A biblioteca bacteriana resultante foi depois recuperada com fago auxiliar gene 3 delta 3 como acima descrito para preparar fago para uma ronda de selecção subsequente. Este processo foi depois repetido um total de 4 rondas de purificação por afinidade com a lavagem dos tubos aumentada até 20 vezes com PBS, 0,1% de Tween-20, e 20 vezes com PBS para as rondas 3 e 4.

Caracterização de ligantes:

Utilizaram-se fagos eluídos da 3.^a e 4.^a rondas de selecção para infectar *E. coli* HB 2151 e produziu-se scFv solúvel (Marks, et al., 1991) a partir de colónias individuais para ensaio. No caso de TNF, recuperou-se também fago a partir de colónias individuais. Os ELISA foram realizados como anteriormente descrito com placas de microtitulação revestidas quer com 10 μ g/ml de TNF- α humano em bicarbonato 50 mM pH 9,6 quer com 10 μ g/ml de Fog-1 em PBS. Os clones positivos no ELISA foram adicionalmente caracterizados por *fingerprinting* de PCR (WO92/01047 exemplo 20) e depois por sequenciação.

Resultados

TNF: scFv solúvel a partir de 1536 colónias e fago a partir de 1152 colónias foram rastreados por ELISA. Os resultados são apresentados na Figura 1, cuja chave é fornecida na breve descrição das figuras (*supra*). Os clones positivos quanto à ligação a TNF- α foram adicionalmente caracterizados por *fingerprinting* de PCR e sequenciação. Deste modo, foram identificados 15 ligantes diferentes. Quatro destes foram sequenciados.

Fog-1: scFv a partir de 96 clones foi rastreado por ELISA e os clones positivos foram adicionalmente caracterizados por *fingerprinting* de PCR e sequenciação. Deste modo, foram identificados e sequenciados quatro ligantes diferentes.

Exemplo 2

Isolamento de especificidades de fragmentos de anticorpo dirigidas contra tiroglobulina humana a partir de uma biblioteca de fragmentos scFv utilizando exibição em bacteriófago fd

O Exemplo 44 da W092/01047 descreve a selecção de fragmentos scFv anticorpo dirigidos contra tiroglobulina bovina a partir de uma biblioteca de fragmentos scFv. Estes foram obtidos a partir de humanos não imunizados, expressos sobre a superfície de fago fd, isolados por selecção contra tiroglobulina bovina. Os resultados demonstraram que é possível o isolamento a partir de uma biblioteca obtida a partir de fragmentos de anticorpo de um indivíduo não imunizado que se ligarão a antígeno ao qual esse indivíduo nunca esteve exposto.

Dezasseis clones que por esta selecção se constatou serem específicos para tiroglobulina bovina foram agora analisados quanto à ligação a tiroglobulina humana num ensaio ELISA (como descrito no exemplo 44 de W092/01047). Nove destes clones ligaram-se também fortemente a tiroglobulina humana com sinais de absorvância entre 1,0 e 1,6, 12 minutos após adição de substrato. Não se encontrou qualquer reactividade cruzada (sinal inferior a 0,05 após 90 min) com um painel de antígenos não relacionados - lisozima de ovo de galinha, BSA, ovalbumina, quimotripsinogénio, citocromo c, hemocianina de lapa *Fissurella*, insulina, cardiolipina e ADN.

Assim, anticorpos com especificidade por epítomos no auto-antigénio humano tiroglobulina podem ser isolados a partir de bibliotecas preparadas a partir de humanos não imunizados.

Foram sequenciados dois clones ligando-se a ambas as tiroglobulinas humana e bovina, α -Thy23 e α -Thy29, e dois clones ligando-se apenas a tiroglobulina bovina, α -Thy32 e α -Thy33.

Exemplo 3

Isolamento de fragmentos de anticorpo dirigidos contra os auto-antigénios humanos mucina MUC1, antigénio carcinoembrionário (CEA) e CD4 solúvel recombinante (rsCD4) a partir de uma biblioteca de exibição em fagos de fragmentos Fv de cadeia simples humanos

A biblioteca de exibição em fagos de fragmentos Fv de cadeia simples, obtida a partir de dadores humanos não imunizados utilizados no Exemplo 1, foi utilizada na selecção para isolar fragmentos de anticorpo dirigidos contra os auto-antigénios mucina MUC1, antigénio carcinoembrionário (CEA) e CD4 solúvel recombinante (rsCD4).

Recuperação da biblioteca

A biblioteca foi recuperada como no Exemplo 1 excepto que se utilizou o fago auxiliar padrão M13K07 (5×10^{10} pfu) para recuperar a biblioteca em vez do fago auxiliar de gene 3 delta (M13 D gene III).

Seleccção de fagos específicos para mucina MUC1 e antigénio carcinoembrionário (CEA)

Os fagos foram seleccionados quanto a ligação utilizando imunotubos (Nunc; Maxisorp) revestidos com antigénio essencialmente como em Marks *et al.*, 1991, ou foram seleccionados numa coluna de antigénio (J. McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-554, 1990). Utilizaram-se os antigénios seguintes: CD4 solúvel recombinante (rsCD4) humano (expresso em baculovírus pela American Biotechnologies Inc. e fornecido pelo MRC AIDS Reagent Project [ADP608]); antigénio carcinoembrionário (CEA) humano; e um péptido de 20

aminoácidos (M. R. Price *et al.*, *Molec. Immunol.* 27 795-802, 1990), que corresponde a um motivo repetido na mucina MUC1 humana (mucina epitelial polimórfica ou PEM associada a tumor) (S. Gendler *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263, 12820-12823, 1988; J. R. Gum *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 407-415, 1990).

CEA (20 mg/ml) e rsCD4 (10 mg/ml) foram revestidos sobre imunotubos de um dia para o outro à temperatura ambiente em solução salina tamponada com fosfato. Para as duas primeiras rondas de selecção, lavaram-se os tubos 10 vezes com PBS, 0,1% (v/v) de Tween 20, e 10 vezes com PBS. Para rondas de selecção subsequentes, lavaram-se os tubos 20 vezes com PBS, 0,1% (v/v) de Tween 20, e 20 vezes com PBS. Os fagos foram eluídos com trietilamina 100 mM como em Marks *et al.*, 1991. Utilizaram-se os fagos eluídos (usualmente 10^6 a 10^7 unidades de transdução) para infectar células *E. coli* TG1. Utilizaram-se aprox. 10^9 bactérias infectadas como inóculo para a recuperação seguinte. A biblioteca foi submetida a 3 a 5 rondas de recuperação e selecção para cada antigénio.

Para selecção de fago ligando-se ao péptido MUC1, o péptido foi acoplado quimicamente a Sepharose 4B (fornecida por M.R. Price). Preparou-se uma coluna de 1 ml, e seleccionou-se o fago como descrito por McCafferty *et al.*, 1990 (*supra*). Resumidamente, a coluna Sepharose-MUC1 foi lavada com PBS contendo 2% de leite em pó desnatado (MPBS) e o fago foi carregado em 1 ml do mesmo tampão. Após lavagem da coluna sucessivamente com volumes de 10 ml de MPBS, PBS pH 7,2, Tris-HCl 50 mM/NaCl 500 mM pH 8,0, e Tris-HCl 50 mM/NaCl 500 mM pH 9,0, o fago foi eluído com 5 ml de trietilamina 100 mM e neutralizado com tampão de fosfato de sódio 0,5 M pH 6,8. Foram realizadas 5 rondas de selecção.

Rastreio e sequenciação de clones

Colónias individuais resistentes à ampicilina da infecção de *E. coli* TG1 com fago eluído, foram rastreadas quer quanto à ligação de fago (Clackson *et al.*, 1991) quer quanto a fragmentos scFv solúveis (Marks *et al.*, 1991). Uma vez que o gene codificando o fragmento de anticorpo está ligado ao gene codificando a proteína de revestimento de fago por um codão âmbar, fragmentos solúveis podem ser segregados a partir de uma estirpe não supressora de bactérias infectadas pelo fago (Hoogenboom *et al.*, 1991). A ligação a antigénio de scFv

solúveis em sobrenadante bacteriano foi detectada com o mAb de ratinho 9E10 (1 µg/ml), que reconhece a marca de péptido C-terminal (Munro e Pelham, *Cell* 46, 291-300, 1986), e anticorpo Fc anti-ratinho conjugado com peroxidase (Sigma), como descrito (Ward *et al.*, 1989). As placas foram revestidas com os antigénios Fog1, TNF α , tiroglobulina bovina e rsCD4 como descrito acima para os imunotubos, e com CEA a 5 mg/ml. Utilizou-se um extracto de urina contendo mucina epitelial polimórfica (PEM) humana com uma concentração de proteína de aproximadamente 10 mg/ml.

A especificidade dos clones isolados foi verificada por ELISA dos fragmentos scFv solúveis utilizando placas revestidas com várias proteínas. As placas foram revestidas com os antigénios Fog-1, TNF α , tiroglobulina bovina, rsCD4, CEA e PEM como acima descrito. Outras proteínas foram revestidas de um dia para o outro à temperatura ambiente numa concentração de 1 mg/ml em PBS (citocromo c [Sigma]) ou em NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6 (albumina de soro bovino, lisozima de clara de ovo de peru, lisozima de clara de ovo de galinha, ovalbumina de galinha, hemocianina de lapa *Fissurella* [CalBiochem], quimotripsinogénio A, inibidor de tripsina de clara de ovo de galinha [Sigma], globulina gama de galinha acoplada a ácido 4-hidroxi-3-nitrofenilacético. Os clones que se verificou darem um sinal de ELISA positivo foram rastreados por PCR e "*fingerprinted*" com a enzima de restrição BstNI, como em Marks *et al.*, 1991, *supra*, para identificar clones diferentes. Exemplos de clones com diferentes padrões de restrição foram seleccionados e as cadeias pesada e leve sequenciadas utilizando um *kit* Sequenase (USB) ou utilizando um *kit* de sequenciação Taq DyeDeoxy Terminator Cycle (Applied Biosystems) e um sequenciador de ADN Applied Biosystems 373A.

Os clones sequenciados foram adicionalmente analisados utilizando o programa MacVector 3.5 (IBI Kodak, New Haven, CT). Os genes VH foram comparados com os 83 segmentos de gene de linha germinal presentes no directório VH compilado por Tomlinson *et al.* (*J. Mol. Biol.* 227 776-798, 1992). Os genes VL foram comparados com 34 segmentos de gene de linha germinal publicados e com 13 segmentos de gene lambda publicados. Não foram incluídas na análise regiões dos genes V codificados por iniciadores de PCR.

Os fragmentos de anticorpo humano seleccionados mostram elevada especificidade contra auto-antigénios

Após duas a cinco rondas de selecção, células *E. coli* foram infectadas com fago eluído e fragmentos de anticorpo produzidos por clones individuais foram rastreados quanto a ligação por ELISA. Fagos seleccionados com o péptido MUC1 de 20 aminoácidos (Price *et al.*, 1990, *supra*), que corresponde a um motivo repetido em mucina MUC1 humana (mucina epitelial polimórfica ou PEM associada a tumor) (Gendler *et al.*, 1988, *supra*; Gum *et al.*, 1990, *supra*), foram rastreados quanto a ligação a PEM humana e por este motivo ligam-se tanto ao péptido como à proteína. Sequenciaram-se os clones de genes V com actividades de ligação e identificou-se um clone para cada antigénio de CEA, PEM e rsCD4 (Tabela I). O aparecimento apenas de baixos números de clones ligando-se a CEA, PEM e CD4 solúvel recombinante (rsCD4) humano, mesmo após várias rondas de selecção, pode reflectir a utilização de VCS-M13 (Stratagene) como fago auxiliar (em vez do fago auxiliar M13DgIII utilizado para os outros antigénios). Populações de partículas de fago(mídeo) produzidas por recuperação com M13DgIII (que não podem produzir pIII) têm avides médias mais elevadas do que as produzidas por recuperação com VCS-M13 (onde o pIII do tipo selvagem codificado pelo fago auxiliar pode competir com fusões scFv-pIII).

Os fragmentos scFv foram depois rastreados quanto à ligação a um painel doutros antigénios de proteína, e constatou-se que eram altamente específicos. Isto é ilustrado na Fig. 2 com os clones individuais com actividade de ligação a CEA humano, MUC1 e rsCD4 humano. Ver breve descrição da Figura 2 (*supra*) para legenda.

Deste modo, fragmentos de anticorpo dirigidos contra os auto-antigénios humanos CEA e MUC1 (que são marcadores de tumor) e rsCD4 podem ser obtidos a partir da mesma biblioteca e todos eles possuem uma especificidade elevada por antigénio.

Exemplo 4

Caracterização de fragmentos de auto-anticorpo por sequenciação de ADN e ligação a antigénio

Os fragmentos de auto-anticorpo isolados nos Exemplos 1, 2 e 3 foram caracterizados por sequenciação de ADN e ligação de antigénio.

Os fragmentos de anticorpo são obtidos a partir de uma gama de genes V não mutados e mutados somaticamente

As sequências de vários clones com auto-especificidade foram determinadas como no Exemplo 3 e contêm ambas as cadeias leves κ e λ (Tabela II). A comparação com as sequências dos segmentos de gene V da linha germinal mais próxima mostra que são utilizadas várias famílias diferentes (VH1, 3, 4 e 5; Vk1 e 4, V11, 2 e 3). Nalguns casos, os genes V são completamente da linha germinal, por exemplo ambos os genes VH e V1 de α Thy-29. No entanto, a maioria dos genes V tem várias diferenças em relação aos segmentos de gene V da linha germinal mais próxima, tanto ao nível dos nucleótidos como ao nível dos aminoácidos (Tabela II), sugerindo que são obtidos a partir de células B mutadas somaticamente. Algumas mutações podem ter surgido durante o processo de amplificação por PCR e montagem, por exemplo os genes VH de α FOG1-G8 e α MUC1-1 e o gene Vk de α Thy-33 surgiram provavelmente de cruzamentos entre dois genes V durante a amplificação por PCR (Tabela II). Adicionalmente, grandes diferenças (por exemplo, o Vk de α FOG1-H6 que difere em 36 nucleótidos) podem ser devidas à utilização de segmentos de gene V desconhecidos. Existe uma homologia surpreendente na CDR3 da cadeia pesada entre α TNF-A1 e α TNF-E1; os genes V de linha germinal são diferentes mas são utilizados os mesmos segmentos JH, e 11/16 resíduos de CDR3 são idênticos. Isto sugere que ambos os fragmentos scFv se podem ligar ao mesmo epítipo de TNF.

Os fragmentos de anticorpo são dirigidos a diferentes epítipos na mesma proteína

Os fragmentos scFv dirigidos contra tiroglobulina bovina do Exemplo 2 foram rastreados quanto a ligação a tiroglobulina humana, que difere apenas em 6 resíduos aminoácido individuais no protómero (Malthiery, Y. e Lissitzky, S. (1987) *Eur. J. Biochem.*, 165, 491-498). Quatro dos doze clones (incluindo α Thy-29) ligaram-se a tiroglobulina humana, enquanto os restantes (incluindo α Thy-32 e α Thy-33) não o fizeram (dados não mostrados). Do mesmo modo, os fragmentos ligando-se ao anticorpo Fog-1 humano foram rastreados quanto a ligação a uma gama de outros anticorpos diferindo em isotipo de cadeia pesada e leve (Fig. 3). Ver breve descrição da Figura 3 para sua legenda (*supra*). O fragmento α FOG1-A4 ligou-se a todos os isotipos de cadeia pesada g1, 2 e 3, mas não a g4 ou m. Por contraste, os fragmentos α FOG1-H6 e α FOG1-A3 não se ligaram a

qualquer dos outros anticorpos, incluindo aqueles do mesmo isotipo que Fog-1, sugerindo que eles são dirigidos ao domínio variável de Fog-1.

Caracterização de fragmentos scFv seleccionados

Os clones seguintes foram escolhidos para purificação em grande escala e caracterização adicional: α FOG1-H6, α FOG1-A3, α TNF-E7 e α Thy-29. Colónias da estirpe de *E. coli* não supressora HB2151, alojando o fagemídeo apropriado, foram utilizadas para inocular 2 litros de 2 x TY contendo 100 μ g ampicilina/ml e 0,1% de glucose. As culturas foram desenvolvidas e induzidas (De Bellis, D. e Schwartz, I. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 1311) e os fragmentos scFv marcados foram purificados utilizando o mAb 9E10 como em Clackson et al., 1991, *supra* e WO92/01047.

A inibição da ligação de 125 I-Fog-1 a antigénio Rh D humano pelos fragmentos scFv purificados por afinidade α FOG1-H6 e α FOG1-A3 foi essencialmente como realizado anteriormente (Gorick, B. D., Thompson, K. M., Melamed, M. D. e Hughes, J. N. (1988) *Vox. Sang.*, 55, 165-170) com as modificações seguintes. Pré-incubaram-se 0,0148 μ g de 125 I-FOG1 com quantidades variáveis de fragmentos scFv purificados α FOG1-H6 ou α FOG1-A3 (0 - 16 μ g) a 37°C durante 1,5 horas, antes de se adicionarem 0,5 μ l de células R1R2 (ou células rr como controlo). Incubou-se depois a mistura durante mais 1,5 horas a 37°C com mistura constante, e finalmente separaram-se as células do sobrenadante. Como controlo, realizou-se também uma titulação com um fragmento scFv purificado dirigido contra lisozima de clara de ovo de peru (α TEL9) (Marks et al., 1991, *supra*).

Efectuaram-se medições cinéticas utilizando ressonância plasmónica de superfície (BIAcore, Pharmacia Biosensor AB) (Jönsson, U., Fägerstam, L., Ivarsson, B., Lundh, K., Löfås, S., Persson, B., Roos, H., Rönnberg, I., Sjölander, S., Stenberg, E., Ståhlberg, R., Urbaniczky, C., Östlin, H. e Malmqvist, M. (1991) *BioTechniques*, 11, 620-627; Jönsson, U. e Malmqvist, M. (1992) em Turner, A. (ed.), *Real Time Biospecific Interaction*. JAI Press Ltd., San Diego, Vol. 2, págs. 291-336). De modo a separar espécies monoméricas e multiméricas, concentraram-se os fragmentos scFv purificados por ultrafiltração e depois fraccionaram-se numa coluna Superdex 75 FPLC (Pharmacia) calibrada em PBS, EDTA 0,2 mM. A

filtração em gel foi monitorizada tanto pela absorvância a 280 nm como em linha por BIAcore com antígeno imobilizado no *chip* sensor (Johnsson *et al.*, 1991).

As experiências cinéticas foram realizadas em duas configurações diferentes. Primeiramente, para analisar a ligação de scFv solúvel, os diferentes antígenos foram imobilizados covalentemente no *chip* sensor (no caso do mAb Fog-1, o anticorpo foi também imobilizado via um mAb de cadeia leve capa de ratinho anti-humano utilizando um *chip* sensor revestido com IgG1 de coelho anti-ratinho). Em segundo lugar, para analisar a ligação do mAb FOG-1 solúvel, o scFv α FOG1-H6 foi imobilizado na superfície do *chip*.

Os antígenos foram acoplados ao *chip* sensor de CM5 através dos seus grupos amina utilizando o *Amine Coupling Kit* (Pharmacia Biosensor AB) (Johnsson, B., Löfås, S. e Lindqvist, G. (1991) *Anal. Biochem.*, 198, 268-277). Diluíram-se os antígenos em tampão acetato 10 mM pH 5,0 até aprox. 25 μ g/ml, e imobilizaram-se 3805 unidades de ressonância (RU) de TNF, 6249 RU de tiroglobulina humana e 5279 RU de FOG1. Para a apresentação bioespecífica de Fog-1, acoplou-se IgG1 de coelho anti-ratinho purificada por afinidade (Pharmacia Biosensor AB) à superfície seguida por um mAb de ratinho anti-capa humana (2300 RU) e depois Fog-1 (2050 RU). Como a ligação de IgG1 de coelho anti-ratinho ao mAb de ratinho era reversível por HCl 10 mM, o complexo foi reconstruído para cada ciclo analítico. Acoplou-se scFv anti-Fog-1 à superfície de CM5 até 1538 RU. Todas as determinações foram realizadas a 25°C em PBS, EDTA 0,2 mM, 0,05% de tensioactivo BIAcore P20 com um caudal constante de 10 μ l/min e um volume injectado de amostra de 35 μ l. Não foi necessário regenerar o antígeno uma vez que os fragmentos scFv se dissociam rapidamente, com a excepção da apresentação bioespecífica de antígeno via IgG1 de coelho anti-ratinho que foi regenerada com HCl 10 mM durante 3 min.

As análises de monómero de scFv foram realizados na gama de concentrações de 100-500 nM, e os dímeros na gama de 40-200 nM excepto para o Fog-1 apresentado bioespecificamente onde a concentração de scFv dimérico era 0,25-1,26 μ M. O Fog-1 foi analisado na superfície de scFv α FOG1-H6 na gama de concentrações de 10-200 nM. Todas as concentrações foram calculadas a partir da absorvância U.V. a 280 nm (assumindo que scFv 0,7 mg/ml dá uma $A_{280} = 1$ [Mach, H., Middaugh, C.R. e Lewis, R. V. (1992) *Anal. Biochem.*, 200, 74-80], e que o Mr de

um monómero de scFv é 30 kD e de um dímero é 60 kD). Não se efectuou qualquer correcção para a fracção de proteína activa, e deste modo as velocidades de associação (*on-rates*) estão subestimadas. A avaliação cinética dos dados foi realizada de acordo com Karlsson, R., Michaelsson, A. e Mattsson, L. (1991) *J. Immunol. Methods*, 145, 229-240, e avaliada no programa Origin 1.1 (Microcal Inc., Northampton, Mass., E.U.A.).

Dois dos fragmentos de anticorpo são dirigidos contra idiotipos de mAb humano Fog-1

A ligação de anticorpo ^{125}I -Fog-1 a glóbulos vermelhos humanos transportando o antígeno Rh D podia ser inibida por ambos os fragmentos scFv $\alpha\text{FOG1-H6}$ e $\alpha\text{FOG1-A3}$. Por este motivo, $\alpha\text{FOG1-H6}$ e $\alpha\text{FOG1-A3}$ são ambos anticorpos anti-idiotípicos, dirigidos a locais, complexando-se com o local de ligação ao antígeno de Fog-1. A extensão de inibição da ligação de ^{125}I -Fog-1 ao antígeno Rh D (em glóbulos vermelhos R1R2 humanos) foi determinada por titulação com fragmentos scFv $\alpha\text{FOG1-H6}$ e $\alpha\text{FOG1-A3}$ purificados por afinidade. (Como controlo, não se observou qualquer inibição da ligação de ^{125}I -Fog-1 utilizando um fragmento scFv (αTEL9) (Marks *et al.*, 1991, *supra*) dirigido contra lisozima de clara de ovo de peru). Com o máximo de 16 pg de scFv (excesso molar de 1000 vezes em relação a ^{125}I -Fog-1), a ligação foi inibida 14,2% ($\alpha\text{FOG1-H6}$) e 20,9% ($\alpha\text{FOG1-A3}$), sugerindo que as afinidades destes fragmentos por Fog-1 são muito inferiores à afinidade de Fog-1 pelo antígeno Rh D ($K_a = 2,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) que se liga de modo monovalente (Gorick *et al.*, 1988, *supra*). Se 100% dos fragmentos estivessem activos, as afinidades dos dois fragmentos pela ligação a Fog-1 podiam ser estimadas como $K_a = 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para $\alpha\text{FOG1-H6}$ e $6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para $\alpha\text{FOG1-A3}$, e isto é consistente com outras medições cinéticas (ver a seguir e na Tabela III).

Os fragmentos scFv podem formar tanto monómeros como dímeros em solução

Fragmentos de anticorpo solúveis foram purificados a partir de sobrenadantes bacterianos por cromatografia de afinidade, por ligação da marca de péptido C-terminal ao mAb 9E10. Após ultrafiltração, os fragmentos foram adicionalmente purificados por filtração em gel FPLC (Pharmacia) em Superdex 75 (Pharmacia), e detectados em linha tanto pela absorvância UV (280 nm) como por ligação a antígeno

imobilizado num *chip* sensor em BIAcore (Pharmacia Biosensor AB). Isto mostrou que os fragmentos scFv emergiram em dois picos, correspondendo em tamanho a monómeros e dímeros. Os dímeros ligam-se mais fortemente ao antígeno imobilizado do que os monómeros devido à sua maior avidéz de ligação. Os dímeros de scFv comportaram-se como monómeros em géis de SDS não redutores, e deste modo não estão ligados por ligações de dissulfureto. Como se observam dois picos na filtração em gel, parece que neste caso os monómeros e dímeros não se interconvertem rapidamente. Presumivelmente, os dímeros são fragmentos scFv interligados através do ligante flexível unindo as cadeias pesada e leve, ou com a cadeia pesada de uma molécula scFv associada com a cadeia pesada da outra. Verificamos que fragmentos Fab de anticorpo produzidos em bactérias podem também formar multímeros (dados não publicados).

Os fragmentos scFv têm afinidades micromolares

A presença de monómeros e dímeros de scFv poderia conduzir a uma sobre-estimativa de afinidade de ligação utilizando métodos de fase sólida. Para determinar a afinidade e a cinética de ligação de fragmentos scFv ao *chip* revestido com antígeno utilizando ressonância plasmónica de superfície, purificámos então os fragmentos por filtração em gel (Tabela III). Para os dímeros, as constantes de velocidade de dissociação foram determinadas como cerca de 10^{-2} s^{-1} e as constantes de velocidade de associação para os dímeros de scFv como cerca de 10^5 - $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (assumindo que a amostra é completamente activa). No caso de α FOG1-H6, o antígeno (o mAb Fog-1) foi imobilizado no *chip* sensor de dois modos, quer directamente quer via um anticorpo IgG1 de coelho anti-ratinho. Os resultados foram quase idênticos por qualquer dos métodos (ver Tabela III). Contudo, a fracção activa de fragmentos scFv varia consideravelmente e poderia conduzir a uma subestimativa da velocidade de associação (e da afinidade de ligação); por exemplo, utilizando titulação de extinção de fluorescência com vários fragmentos scFv dirigidos contra feniloxazolona detectámos apenas 0,06 a 0,38 locais de ligação funcionais por molécula de scFv (resultados não publicados). De facto, as constantes de velocidade de associação calculadas para a associação do fragmento α FOG1-H6 e do anticorpo Fog-1 dependem de ser o anticorpo ($k_{\text{on}} 2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ou o fragmento scFv ($k_{\text{on}} 1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que está imobilizado no *chip* sensor (Tabela III), indicando que o fragmento α FOG1-H6 é

menos activo do que o anticorpo Fog-1. Para os monómeros de scFv, os sinais de ligação eram baixos e foi difícil seguir as cinéticas de ligação à superfície, excepto para a dissociação do monómero α Thy-29 ($k_{\text{off}} = 2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). Contudo, a estabilização quatro vezes maior do dímero de fragmento α Thy-29 (ver a seguir), sugere que as constantes de velocidade de dissociação dos outros monómeros são $>10^{-2} \text{ s}^{-1}$, talvez 10^{-1} s^{-1} .

A maior estabilidade dos dímeros de scFv no *chip* sensor, comparada com a dos monómeros, indica que os dímeros são bivalentes. Os dímeros de scFv são deste modo análogos às duas cabeças do anticorpo IgG (mas com diferente espaçamento entre as cabeças), e as suas avides de ligação foram estimadas como cerca de 10^7 M^{-1} a partir de $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ (Tabela III). As afinidades dos monómeros têm de ser menores em virtude da sua dissociação mais rápida a partir da superfície. Para o monómero α Thy-29, e assumindo que a constante de velocidade de associação é a mesma que para o dímero (Mason, D.W. e Williams, A.F. (1986) *Kinetics of Antibody Reactions and the Analysis of Cell Surface Antigens*. Blackwell Scientific, Oxford), podemos estimar uma afinidade de cerca de $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Estas afinidades, calculadas a partir das constantes de velocidade, medidas por ressonância plasmónica de superfície, parecem ser similares às medidas em solução por técnicas de extinção de fluorescência. Por exemplo, a afinidade de ligação do fragmento scFv monómero α TEL9 (Marks et al., 1991) que se liga a lisozima de peru (e que foi obtido a partir da mesma biblioteca) foi estimada como $3,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ utilizando ressonância plasmónica de superfície (Tabela III), e como $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ por extinção de fluorescência (Marks et al., 1991, *supra*).

As afinidades dos anticorpos isolados são típicas de anticorpos da resposta imunitária primária de ratinho (Foote, J. e Milstein, C. (1991) *Nature*, 352, 530-532). As cinéticas de associação dos fragmentos de anticorpo aos auto-antígenos de proteína (10^5 a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) são também típicas de interacções Ab-proteína anteriormente caracterizadas. Contudo, as cinéticas de dissociação (10^{-2} s^{-1}) são relativamente rápidas para interacções Ab-proteína (mas ambas as velocidades são lentas comparadas com muitas interacções Ab-hapteno). À primeira vista, é surpreendente que pudéssemos isolar fragmentos scFv com estas velocidades de dissociação rápidas, uma vez que seria de esperar que um fago "monomérico" fosse

retido no suporte sólido durante a lavagem. No entanto, fragmentos scFv são exibidos de modo multivalente no fago, especialmente utilizando o fago auxiliar M13DgIII, e alguns dos scFv, que tendem a formar dímeros em solução, podem também formar dímeros no fago. As interações multivalentes com antígeno ajudam a reter o fago, permitindo isolar o fago de scFv codificado.

Reportórios de gene V combinatórios aleatórios, obtidos a partir do ARNm de animais imunizados, são enriquecidos em genes V de cadeia pesada ou leve codificando parte de um local de ligação ao antígeno e isto facilita o isolamento de fragmentos de ligação de antígeno utilizando tecnologia de fago, ainda que as combinações de genes V de cada linfócito B pareçam ser grandemente destruídas. Locais de ligação ao antígeno podem também ser gerados *de novo* pela combinação aleatória de cadeias, como ilustrado pelo isolamento de fragmentos scFv contra antígenos estranhos a partir de dadores humanos imunizados (Marks *et al.*, 1991, *supra*).

"Auto-anticorpos naturais", anticorpos auto-reactivos isolados a partir de dadores saudáveis, tendem a ser de baixa afinidade e poliespecíficos e podem bem ser produzidos por um subconjunto discreto de células B, o conjunto de actividade interna (Holmberg, D. e Coutinho, A. (1985) *Immunol. Today*, 6, 356-357), participado em parte por células B CD5+ (Casali, P. e Notkins, A. L. (1989) *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 513-535). Em contraste, os fragmentos scFv anti-próprios que produzimos são altamente específicos na ligação a antígeno apesar de terem apenas afinidades micromolares. Esta é uma constatação surpreendente e valiosa. As suas afinidades podiam ser presumivelmente melhoradas *in vitro*, por exemplo, a afinidade de um fragmento scFv pelo hapteno feniloxazolona obtido a partir da biblioteca de fago (e, tal como os auto-anticorpos aqui descritos, com uma velocidade de dissociação relativamente rápida) foi melhorada de $K_a = 3,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para $9,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ por baralhamento de cadeias (*chain shuffling*) (W092/01047; Marks *et al.*, 1992b, *Biotechnology* 10, 779-783, 1992). Isto permitiria a criação de anticorpos humanos de elevada afinidade, altamente específicos, dirigidos contra auto-antígenos para utilização em terapia humana.

Exemplo 5:**Criação de uma biblioteca sintética**

Por exibição de reportórios de anticorpo sobre a superfície de fago filamentoso e selecção do fago com antigénio¹, podemos mimetizar a selecção imunitária^{2,3} e produzir anticorpos humanos a partir dos genes V rearranjados de dadores não imunizados⁴. Anticorpos humanos foram agora produzidos por síntese a partir de elementos de gene V definidos. Um reportório de 49 segmentos de gene V_H de linha germinal humana foi rearranjado *in vitro* unindo um "segmento D" sintético de cinco resíduos aminoácido aleatórios e um segmento J, para criar uma terceira região determinante de complementaridade (CDR) sintética de oito resíduos. Os genes V_H rearranjados foram clonados com uma cadeia leve V_{lambda}3 humana como fragmentos Fv de cadeia simples para exibição em fagos. A biblioteca de 10⁷ fagos foi seleccionada com um hapteno 2-fenil-oxazol-5-ona (phOx) conjugado com albumina de soro bovino (BSA), e isolaram-se fagos que codificavam fragmentos com actividade de ligação específica por phOx-BSA, e com afinidades por phOx-ácido gama-aminobutírico (phOx-GABA) na gama micromolar. A comparação de vinte e um clones com sequências únicas mostrou que a "resposta imunitária" *in vitro* ao hapteno estava grandemente restringida ao segmento V_H26 (família V_H3 família)⁶ com um resíduo aromático invariante (Tyr, Phe, Trp) no resíduo 98 de CDR3. A utilização de genes V rearranjados *in vitro* pode permitir o desenho de bibliotecas de anticorpo com tendência no sentido da ligação de antigénios de estrutura conhecida, e a criação de anticorpos humanos terapêuticos com imunogenicidade reduzida.

Domínios variáveis de anticorpo consistem de uma estrutura em folha β com três laçadas de sequência hipervariável ou CDR⁵. As laçadas criam locais de ligação ao antigénio de uma variedade de formas, variando de superfícies planas⁷ a bolsos⁸. Para cadeias pesadas humanas, as diversidades de sequência das duas primeiras CDR são codificadas por um reportório de cerca de cinquenta segmentos V_H de linha germinal. (I.M. Tomlinson *et al.*, *supra*). A terceira CDR é gerada a partir da recombinação destes segmentos com cerca de trinta segmentos D e seis segmentos J⁹, e ainda que esta sequência seja altamente variável, inclui frequentemente uma ponte salina desde Asp101 da laçada até Arg94 da estrutura (*framework*)¹⁰. As estruturas e comprimentos

das duas primeiras CDR estão restringidas¹¹, mas os da CDR3 diferem grandemente, com comprimentos na gama de 4 a 25 resíduos⁵.

Foi criada uma biblioteca de genes V_H rearranjados com uma CDR3 de oito resíduos incluindo Asp101, em combinação com uma cadeia leve V_{λ} individual (ref.12). Quarenta e nove segmentos V_H de linha germinal codificando a maior parte do reportório V_H humano (Tomlinson *et al.*, *supra*) foram cada um amplificados utilizando a reacção em cadeia da polimerase¹³ e iniciadores de oligonucleótido que introduzem um segmento D sintético (de 15 bases de sequência aleatória na extremidade 3' do segmento V_H) e um segmento J, em conjunto codificando uma laçada de CDR3 de oito resíduos (Fig. 4). Os segmentos rearranjados foram reunidos e clonados para exibição em fagos com uma cadeia leve V_{λ} 3 humana, criando uma biblioteca sintética de 10^7 clones de fago. Tal como o sistema imunitário, a biblioteca sintética de 10^7 clones de fago apenas pode fazer uso de uma pequena fracção da diversidade potencial. Assim, a diversidade é potencialmente de $49 \times 32^5 = 1,6 \times 10^9$ sequências de nucleótidos diferentes, ou $49 \times 20^5 = 1,6 \times 10^8$ sequências de aminoácidos diferentes.

A biblioteca foi submetida a quatro rondas de crescimento e selecção em tubos revestidos com phOx-albumina de soro bovino (BSA), e os clones foram rastreados como fragmentos Fv de cadeia simples^{15,16} solúveis¹⁴ quanto a actividade de ligação a phOx-BSA por ELISA⁴. Após a terceira e quarta rondas, identificaram-se 14/96 e 61/96 clones respectivamente com actividades de ligação a phOx-BSA e destes (29 testados) nenhum se ligou a outras proteínas (ver legenda da Tabela B). Adicionalmente, o hapteno solúvel podia competir com a sua ligação a placas revestidas com phOx-BSA (Tabela B).

A sequenciação revelou que muitos (21/29) dos ligantes de phOx eram únicos, com uma CDR3 de oito resíduos, e utilizavam quer um segmento da família V_H4 , quer um de três segmentos da família V_H3 (Tabela B). Em conjunto, estes segmentos utilizam três das sete dobras "canónicas" disponíveis para as primeiras duas laçadas hipervariáveis de segmentos V_H humanos. (C. Chothia, *et al.*, *supra*). A maioria dos clones únicos (16/21) foi obtida a partir do segmento $VH26$ ⁶ e tem sequências relacionadas na terceira laçada hipervariável; neste grupo, o primeiro resíduo tende a ter uma cadeia lateral alifática ramificada (15/16), o segundo resíduo tende a ser lisina ou

arginina (11/16), enquanto o quarto resíduo é sempre um resíduo aromático (muito frequentemente tirosina).

As afinidades (K_d) de dois dos ligantes mais fortes (Ox 13 e Ox-31, Tabela B) por phOx-GABA foram determinadas por titulação de extinção de fluorescência¹⁷ como $3,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ e $6,7 \pm 0,7 \mu\text{M}$ respectivamente. Ainda que a biblioteca anticorpos sintéticos não possua os diversos comprimentos de VH-CDR3 e as diferentes cadeias leves de anticorpos produzidos *in vivo*, as afinidades por phOx-GABA são comparáveis com $0,5 \mu\text{M}$ para um anticorpo (fago) produzido a partir de dadores humanos não imunizados⁴, ou $1 \mu\text{M}$ para vários hibridomas a partir de uma resposta imunitária primária de ratinho¹⁸ (mas ver aviso, legenda da Tabela A). Para melhorar estas afinidades, podem-se alterar sistematicamente (ver abaixo) os muitos anticorpos phOx diferentes seleccionados (Tabela A).

Em princípio, a utilização de bibliotecas de exibição em fagos de genes V rearranjados *in vitro* oferece uma alternativa atractiva aos rearranjados *in vivo*⁴. Em primeiro lugar, as regiões de estrutura e as primeiras duas laçadas hipervariáveis de ambas as cadeias pesada e leve dos anticorpos humanos sintéticos criados a partir da biblioteca são essencialmente da linha germinal. Isto contrasta com os anticorpos de fago "primários" seleccionados a partir de genes V humanos rearranjados *in vivo*, nos quais a extensão de mutação somática varia grandemente⁴. Deixando de lado o polimorfismo, os segmentos de gene VH são idênticos em indivíduos diferentes, e os anticorpos sintéticos são potencialmente menos imunogénicos. Alterando os comprimentos e sequências das laçadas CDR3 de cadeia pesada e leve, ou localizando as mutações mínimas nas outras laçadas CDR, ou por baralhamento com cadeias leves de "linha germinal" sintéticas^{19,20}, pode ser possível melhorar as suas afinidades mantendo ao mesmo tempo o seu carácter de linha germinal.

Em segundo lugar, ambos os tipos de bibliotecas estão altamente afectados por tendências. Nas bibliotecas naturais, a tendência está fora do nosso controlo, e é imposta, por exemplo, por variação alélica, polimorfismo de deleção e deleção de clones auto-reactivos. Na biblioteca sintética, a tendência pode ser introduzida sistematicamente. Aqui, por exemplo, foram escolhidos todos os segmentos de gene VH e,

desse modo, a dobragem das primeira e segunda laçadas hipervariáveis; foram também fixados o comprimento e diversidade de VH-CDR3 e a cadeia leve. Ainda que tenham sido sugeridas² várias formas de produzir diversas bibliotecas sintéticas, deverá também ser possível incorporar princípios de *design* nas estruturas codificadas. Se a forma do antigénio fosse conhecida, um invólucro de locais de ligação aproximadamente complementares podia ser desenhado e construído com elementos de gene V definidos. A utilização destas bibliotecas de "designer" favoreceria o isolamento de anticorpos com afinidades mais elevadas.

Tabela A

Família	N.º de segmentos VH *	Tamanho da biblioteca × 10 ⁻⁶ (%)
	genes	
V _H 1	14 1-5, 7, 8, 10, 12, 14, 2,3 (20) 15, 20, 21, 25	
V _H 2	1 27	1,0 (9)
V _H 3	23 29-33, 35, 38-40, 42, 2,1 (19) 44-54, 58, 59	
V _H 4	9 63-71	2,6 (23)
V _H 5	1 73	1,4 (12)
V _H 6	1 74	1,9 (17)
Total:	49	11,3 (100)

*para simplicidade, os segmentos V_H são listados de acordo com nomenclatura DP de Tomlinson *et al.*, *supra*.

Tabela A - Composição da biblioteca sintética

Utilizaram-se quarenta e nove segmentos V_H humanos (Tomlinson *et al.*, *supra*), um para cada uma das famílias de genes V_H2, V_H5 e V_H6 e múltiplos segmentos para as outras três famílias, e clonaram-se de acordo com família. Os clones dos segmentos V_H de cada família foram verificados quanto à presença de inserção (em média 85%) e reuniram-se numa única grande biblioteca como na Tabela B, criando uma tendência (controlada) para certas famílias de genes. Os segmentos das famílias V_H2, V_H5, V_H6 estão desse modo "sobre-representados"

em relação aos segmentos doutras famílias. A sequenciação de trinta e cinco clones a partir da biblioteca não seleccionada confirmou que estavam presentes segmentos V_H de cada família, e que os nucleótidos estavam presentes nas proporções esperadas no segmento D, mas com uma ligeira tendência para C. (Na primeira e na segunda posição de cada codão, A, 21,3%; G, 17,9%; C, 33,7% e T, 27,1%; na terceira posição, G, 42,6% e T, 57,4%). Foram também verificados os níveis de expressão dos fragmentos de anticorpo e foram identificados segmentos V_H em clones com níveis de expressão detectáveis, por exemplo V_{H1} (DP-7), V_{H2} (DP-27), V_{H3} (DP-29, 35, 38, 44, 47, 51, 53), V_{H4} (DP-63, 69), V_{H5} (DP-73) e V_{H6} (DP-74).

Métodos

Os clones foram verificados quanto à presença da inserção por "rastreamento de PCR"²¹ com oligonucleótidos LMB3 e PHEN-SEQ (ref. 4) e sequenciados a partir de ADN de cadeia dupla pelo método de terminação de cadeia de dideoxi²² com o oligonucleótido LINKSEQ (5'-CGA TCC GCC ACC GCC AGA G-3'). (Os números nas tabelas estão corrigidos quanto à inserção). A expressão de fragmentos scFv solúveis foi verificada por *spotting* de 10 µl de sobrenadante de culturas em *E. coli* HB2151 induzidas de um dia para o outro (ref. 14) sobre um filtro de nitrocelulose utilizando um dispositivo *slot-blot* (Minifold II, Schleicher e Schuell), e detecção dos fragmentos scFv marcados com péptido ligados com anticorpo 9E10²³ e anticorpos anti-ratinho marcados com peroxidase (Sigma).

Tabela B

Clone	Família	Gene de linha germinal *	Estrutura canónica de laçada *	I ₅₀ ^Ø
Ox-31	V _H 3	DP-42	1-1	26
Ox-15	V _H 3	DP-45	1-1	>300
Ox-18	"	"	"	>300
Ox-33	V _H 3	DP-47	1-3	20
Ox-13	"	"	"	50
Ox-9	"	"	"	80
Ox-7	"	"	"	86
Ox-30	"	"	"	86
Ox-12	"	"	"	86
Ox-5	"	"	"	100
Ox-3	"	"	"	125
Ox-20	"	"	"	125
Ox-21	"	"	"	125
Ox-4	"	"	"	130
Ox-10	"	"	"	150
Ox-14	"	"	"	180
Ox-19	"	"	"	250
Ox-25	"	"	"	>400
Ox-27	"	"	"	¶
Ox-2 [§]	V _H 4	DP-67	2-1	>400
Ox-1	"	"	"	>400

* Tomlinson *et al.*, *supra*, Chothia *et al.*, *supra*.
^Ø em µM, de acordo com ELISA de competição com phOx-GABA.
[§] mostra mutação V67A em FR3.
[¶] Não determinado.

Tabela B - Ligantes de phOx isolados a partir da biblioteca sintética

Prepararam-se os fagos a partir da biblioteca por recuperação com VCS-M13, e submeteram-se a rondas de selecção em tubos revestidos com phOx-BSA como na ref.4. As sequências de 21 fagos ligando-se a phOx revelaram quatro segmentos VH de linha germinal, DP-42, 45, 47 (família VH3) e DP-67 (família VH4). O DP-47 é idêntico a VH26 (ref.6, corrigida na ref.24), enquanto DP-42, DP-45 e DP-67 diferem apenas em um ou alguns resíduos de estrutura em relação a 8-1B (ref.25), 65-2

(ref.26) ou VH4.22 (ref.27), respectivamente. Clones a partir da biblioteca não seleccionada utilizando o segmento V_H DP47 e sem o padrão característico de CDR3 não se ligaram a phOx. Dos 21 ligantes de phOx testados, nenhum se ligou a BSA, NIP-BSA, plástico, quimotripsinogénio A, citocromo c, tiroglobulina bovina, hemocianina de lapa *Fissurella* ou lisozima de clara de ovo de peru. Verificou-se que quatro clones que se ligavam a BSA (mas não a phOx) eram contaminantes (clones α BSA3, da ref.4).

Métodos

Como na ref.4. As afinidades relativas dos fragmentos scFv forma determinadas por ELISA de inibição²⁸. Realizaram-se diluições em série de ácido 4-gama-aminobutírico-metileno-2-feniloxazol-5-ona (phOx-GABA), com concentrações na gama de 6 a 400 μ M, em 4% de Marvel-PBS, e adicionou-se sobrenadante de scFv. Anotou-se a concentração de phOx-GABA resultando numa redução de 50% do sinal (I₅₀) para a ligação a phOx-BSA. Determinaram-se as afinidades dos clones Ox-13 e Ox-31 para phOx-GABA por titulação de extinção de fluorescência utilizando scFv purificado pela marca c-myc (ref.4). Idealmente, a afinidade pelo conjugado phOx-BSA teria sido medida directamente, ou a afinidade por phOx-ácido caprónico, mas utilizou-se aqui phOx-GABA para permitir uma comparação com os dados de hibridoma de ref.18. As afinidades dos anticorpos pelo conjugado de phOx, ou pelo phOx-ácido caprónico são provavelmente melhores do que as medidas para phOx-GABA.

Figura 4 - Mostra a montagem de genes VH rearranjados (ver texto)

Métodos

Um oligonucleótido sintético SYNLIB1 (ver Tabela IV) introduziu um segmento D com uma sequência de aminoácidos aleatória de cinco resíduos, um segmento J e um local de restrição XhoI, na extremidade 3' de cada um de 49 segmentos V_H de linha germinal humana (Tomlinson *et al.*, *supra*). Utilizou-se o iniciador na reacção em cadeia da polimerase¹³ com iniciadores *back* baseados na família V_H (VHBACK) incorporando um local NcoI⁴, HuVH1BackSfi a HuVH6BackSfi. Cada clone de segmento V_H (fornecido como molde de cadeia simples em vector M13) foi amplificado separadamente a 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min, e 72°C durante 1,5 min, durante 25

ciclos, num PHC-3 thermocycler (Techne). Cada amplificação foi verificada por electroforese em gel de agarose, e quantidades similares de ADN a partir de segmentos V_H da mesma família foram reunidas, digeridas com NcoI e XhoI, e clonadas no vector pHEN1 (ref.14) transportando um domínio variável de cadeia leve $V_{\lambda}3S1$ rearranjado (IGLV3S1; ref.12) retirado de um fragmento scFv ligando-se a BSA⁴.

Se, em vez de um oligonucleótido aleatório, fosse utilizado um oligonucleótido codificando uma CDR, e.g. de um roedor, isto imprimiria esta CDR não humana no produto de biblioteca humana sintética.

Referências mencionadas no Exemplo 5

McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell D. J. (1990). *Nature*, 348, 552-554.

Milstein, C. (1990). *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, 239, 1-16.

Winter, G. & Milstein, C. (1991). *Nature*, 349, 293-299.

Marks, J.D., et al. (1991). *J. Mol. Biol.*, 222, 581-597.

Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M. & Gottesman, K.S. "Sequences of proteins of immunological interest" (US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office, 1987).

Matthyssens, G. & Rabbits, T.H. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6561-6565.

Amit, A.G., Mariuzza, R.A., Phillips, S.E. & Poljak, R. J. (1986). *Science*, 233, 747-753.

Alzari, P.M., et al. (1990). *Embo. J.*, 9, 3807-3814.

Ichihara, Y., Matsuoka, H. & Kurosawa, Y (1988). *Embo. J.*, 7, 4141-4150.

Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917.

Chothia, C., et al. (1989). *Nature*, 342, 877-883.

Frippiat, J.P., et al., (1990). *Nucleic Acids Res.*, 18, 7134.

Saiki, R.K., et al. (1985). *Science*, 230, 1350-1354.

- Hoogenboom, H.R., et al. (1991). *Nucleic Acids Res.*, 19, 4133-4137.
- Huston, J.S., et al. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5879-5883.
- Bird, R.E., et al. (1988). *Science*, 242, 423-426.
- Eisen, H.N. (1964). *Meth. Med. Research*, 10, 115-121.
- Foote, J. & Milstein, C. (1991). *Nature*, 352, 530-532.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1991). *Nature*, 352, 624-628.
- Roberts, A.J., et al. (1992). *Bio/Technology*, para impressão.
- Gussow, D. & Clackson, T. (1989). *Nucleic Acids Res.*, 17, 4000.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
- Munro, S. & Pelham, H.R.B. (1986). *Cell*, 46, 291-300.
- Chen, P.P., Liu, M. F., Sinha, S. & Carson, D. A. (1988). *Arthritis Rheum.*, 31, 1429-1431.
- Berman, J.E., et al. (1988). *Embo J.*, 7, 727-738.
- Matsuda, F., et al. (1990). *Embo J.*, 9, 2501-2506.
- Sanz, I., et al. (1989). *Embo. J.*, 8, 3741-3748.
- Rath, S., Stanley, C. M. & Steward, M. W. (1988). *J. Immunol. Methods*, 106, 245-249.

Exemplo 6

Isolamento de fragmentos de anticorpo específicos para factor- α de necrose de tumor a partir de uma biblioteca sintética humana de linha germinal

Um clone codificando um fragmento de anticorpo específico para factor- α de necrose de tumor foi isolado a partir de uma biblioteca sintética humana de linha germinal. Esta biblioteca foi preparada como descrito no Exemplo 5, excepto que se utilizou o oligonucleótido SYNLIB2 em vez de SYNLIB1, pelo que

foi gerado um fragmento V_H CDR3 de 5 aminoácidos. A biblioteca foi seleccionada contra factor- α de necrose de tumor, como descrito no Exemplo 1 para a biblioteca obtida a partir de humanos não imunizados. Após quatro rondas de selecção, isolou-se um anticorpo de fago (e o fragmento solúvel correspondente) com actividade de ligação a TNF. A região V_H do fragmento scFv (α TNF-10) foi obtida a partir do segmento VH DP-45 (Tomlinson *et al.*, 1992, *supra*). Os clones de ligação de hapteno α NIP-6, α NIP-12, α Ox-15 e α Ox-18 são também obtidos a partir deste segmento, ainda que cada um destes fragmentos fosse, apesar disso, específico para ligação a hapteno ou TNF. Isto indica que locais de ligação ao antigénio com especificidades inteiramente diferentes podem ser criados na mesma estrutura de anticorpo por substituição apenas de CDR3. A ligação a antigénios não específicos foi avaliada por ELISA como descrito no Exemplo 1.

Exemplo 7

Isolamento de fragmentos Fv de cadeia simples ligando-se a tiroglobulina humana e a um anticorpo monoclonal humano a partir de uma biblioteca sintética humana de linha germinal contendo sequências VH CDR3 de diferentes comprimentos

Uma biblioteca de fragmentos Fv de cadeia simples sintética humana de linha germinal foi preparada de um modo análogo à biblioteca no Exemplo 5, para incluir segmentos VH de linha germinal e regiões DH e JH sintéticas, gerando regiões VH CDR3 de 4 a 12 aminoácidos. Foi fornecida uma cadeia leve rearranjada de linha germinal individual. Esta biblioteca de fago tem sido utilizada como fonte de fragmentos de anticorpo com especificidades anti-humano.

Cinquenta segmentos de gene VH de linha germinal (Tomlinson *et al.*, 1991 *supra*, como no Exemplo 5) foram amplificados com oligonucleótidos para introduzir uma CDR3 completamente randomizada variando em comprimento de 4 a 12 resíduos. Numa primeira reacção de PCR, cada gene foi amplificado com o seu iniciador VHBACK específico da família (um de VH1BACKSfi a VH6BACKSfi; Marks *et al.*, 1991 *supra*; W092/01047) na extremidade 5', e, hibridando-se na extremidade 3', com um de cada um dos oligonucleótidos da série SYNLIB4 - SYNLIB12 (Tabela IV). A PCR continha 2,5 pmol de cada um dos pares apropriados de oligonucleótidos por mistura reaccional

de 50 µl contendo dNTP 250 µM, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, TrisHCl 20 mM (pH 8,8), MgCl₂ 2 mM, 100 µg/ml de BSA e 1 µl (1 unidade) de ADN-polimerase Taq (Cetus). O molde era 1 µl de uma reserva bacteriana de *E. coli* infectada com um clone de fago M13 codificando o gene V de linha germinal apropriado. O ciclo de amplificação foi 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min e 72°C durante 1,5 min. Após 25 ciclos, adicionaram-se 30 pmol do mesmo oligonucleótido VHBACK e 30 pmol de JHSAL (Tabela IV), e continuou-se a PCR durante 15 ciclos, introduzindo um local de clonagem SalI na extremidade 3' do gene VH. Após verificar que uma banda do tamanho apropriado era observada na electroforese em gel agarose gel, recolheram-se os produtos de PCR de todas as amplificações efectuadas com o mesmo iniciador SYNLIB, cortaram-se com NcoI e SalI, e clonaram-se em pHEN1-V 3 cortado com NcoI-XhoI (pHEN1 contendo IGLV3S1 clonado) como no Exemplo 5. Deste modo, prepararam-se 9 bibliotecas (cada uma com um comprimento de CDR3 particular), cada uma contendo entre 5×10^6 e 5×10^7 clones.

Seleccção

Preparou-se fago a partir das nove bibliotecas diferentes por recuperação com VCS-M13 como descrito em Exemplo 3. Misturou-se fago a partir das nove bibliotecas individuais para dar uma grande biblioteca e submeteu-se a selecção com um de cada um de 2 antigénios; tubos Immunosorp foram revestidos com OAK3 (anticorpo anti-Rhesus D humano, IgG3, k) de um dia para o outro em tampão carbonato (NaHCO₃ 0,1 M, pH 9,6 a 100 µg/ml) ou com tiroglobulina humana (revestida a 100 µg/ml em PBS). As selecções foram realizadas como no Exemplo 3.

Rastreio

O ELISA foi realizado como descrito em Hoogenboom et al., 1991 *supra*. Placas de ELISA foram revestidas de um dia para o outro com OAK3 a 100 µg/ml em PBS à temperatura ambiente ou com tiroglobulina humana a 100 µg/ml à temperatura ambiente.

Resultados

Após quatro rondas de selecção em tubos revestidos com OAK3, utilizou-se fago eluído para infectar HB2151, e analisaram-se fragmentos scFv solúveis quanto a ligação por ELISA. 59/96 clones foram identificados como positivos no ELISA de OAK3.

A biblioteca sintética humana de linha germinal foi também submetida a: 5 rondas de selecção em tubos revestidos com tiroglobulina humana, 80/96 clones foram identificados como positivos num ELISA de fago de clones individuais recuperados com VCS-M13.

Dois de cada um dos clones positivos foram analisados num ELISA quanto a ligação contra uma gama de antigénios (OAK3, tiroglobulina humana, phOx-BSA, NIP-BSA, BSA, ovalbumina, quimotripsinogénio-A, estreptavidina, citocromo c, KLH, lisozima de clara de ovo de peru). Os dois clones ligando-se a OAK-3 (como fragmentos scFv solúveis) deram ambos sinais aproximadamente 3 vezes mais elevados do que os valores de fundo em ELISA com OAK3. Os dois clones ligando-se a tiroglobulina (como fragmentos scFv exibidos em fago) deram ambos sinais aproximadamente 5 vezes mais elevados do que os valores de fundo em ELISA com tiroglobulina. Constatou-se que todos os clones eram altamente específicos pelo antigénio contra o qual tinham sido seleccionados. Por hibridação com iniciadores específicos da família (J. D. Marks et al., *Eur. J. Immunol.* 21, 985-991 1991), o segmento VH de todos os quatro clones foi identificado como sendo da família VH3. O comprimento de CDR3 de cada clone foi analisado por amplificação da CDR3 com oligonucleótidos CDRFOR e CDRBACK (Tabela IV), e análise do produto num gel de poliacrilamida a 8%. Para os dois clones ligando-se a OAK3, identificámos um comprimento de 4 ou 7 resíduos aminoácido, enquanto os clones ligando-se a tiroglobulina utilizam ambos um comprimento de CDR3 de 10 resíduos.

Deste modo, foram isolados fragmentos scFv de anticorpo ligando-se a um anticorpo monoclonal humano e a um auto-antigénio humano a partir de uma biblioteca sintética de linha germinal humana.

Exemplo 8

Isolamento de fragmentos de anticorpo desencadeando a actividade do receptor de interleucina-1

A biblioteca de fragmentos Fv de cadeia simples obtida a partir de um humano não imunizado que foi descrita no Exemplo 1 é utilizada para seleccionar anticorpos que desencadearão a actividade do receptor de interleucina-1. Isolam-se primeiro fragmentos de anticorpo que se ligam ao

domínio externo solúvel do receptor de interleucina-1 (IL-1R) de células T. Clones de anticorpo que são assim identificados são depois analisados em ensaios quanto à actividade biológica do tipo interleucina-1. O IL-1R em células T murinas e humanas é uma glicoproteína da superfície celular de 80 kD altamente homóloga que se liga a interleucina-1 α e a interleucina-1 β . Um clone de ADNc codificando os 316 aminoácidos N terminais do domínio externo do receptor murino foi expresso em células HeLa (S.K. Dower *et al.* *J. Immunol.* 142, 4314-4320, 1989). A molécula de IL1-R solúvel assim expressa foi purificada e mostra propriedades de ligação indistinguíveis das da molécula de IL-1R a todo o comprimento, formando-se um complexo entre uma única molécula de IL1-R solúvel e IL-1. Esta molécula de receptor solúvel liga-se a interleucina-1 humana. O receptor de interleucina-1 de células T humanas foi clonado e sequenciado por J.E. Sims *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8946-8950, 1989). O domínio externo solúvel do receptor de IL1 humano, aminoácidos 1 a 316, é expresso em células HeLa e purificado como descrito para o receptor murino.

A biblioteca humana não imunizada recuperada é primeiro seleccionada contra o receptor de IL-1 solúvel humano recombinante, correspondendo ao domínio externo do receptor de IL-1. Imunotubos são revestidos como receptor de IL-1 solúvel como descrito no Exemplo 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ e a selecção é realizada como descrito no Exemplo 1 para um total de quatro rondas de selecção por afinidade.

Clones ligando-se ao receptor de IL-1 solúvel são caracterizados por ELISA utilizando placas de microtitulação revestidas com receptor de IL-1 solúvel recombinante a 10 $\mu\text{g/ml}$, como descrito para TNF- α no Exemplo 3. Fragmentos de anticorpo apresentando sinais de ELISA significativos com receptor de IL-1 solúvel mas não com antígenos não específicos são depois escolhidos para estudo adicional.

Os clones de anticorpo isolados deste modo são depois expressos como fragmentos scFv solúveis em *E. coli* e purificados, como descrito no Exemplo 4, por cromatografia afinidade com mAb 9E10. A ligação a receptores humanos é avaliada utilizando a ligação de fragmento de anticorpo marcado com ^{125}I à linha de células de fibroblasto humano TIG-1 expressando o receptor de interleucina-1, basicamente como descrito por T. Takii *et al.*, (*Eur. J. Immunol.* 22, 1221-1227 1992) para determinação da afinidade de ^{125}I -IL1 α pelo receptor

nestas linhas de células. Os fragmentos de anticorpo purificados que mostram ligação de receptor são utilizados num ensaio de rastreio biológico utilizando células epiteliais humanas para examinar estes quanto à estimulação da síntese de prostaciclina (PGI₂) e de factor de activação de plaquetas (PAF) como descrito por E. Dejana *et al.*, (*Blood* 69, 695-699, 1987). Estes estudos identificarão fragmentos de anticorpo que têm uma especificidade anti-própria contra receptor de IL-1 que desencadeia actividade de receptor. A actividade pode ser quantificada em relação à interleucina-1 α humana utilizando um bioensaio padrão para IL-1 α , por exemplo proliferação da linha de células T auxiliares D10S utilizando incorporação de ³H-timidina (S.F. Orencole e C.A. Dinarello *Cytokine* 1, 14-22, 1989) ou um ensaio de proliferação de conversão como descrito por A.J. Gearing *et al.*, (*J. Immunol. Methods* 99, 7-11, 1987).

Tabela I Frequência de clones de ligação isolados a partir da biblioteca de scFv não imunizada após selecção

Antigénio	Rondas de selecção					N.º de clones únicos
	1	2	3	4	5	
Tiroglobulina (bovina)	-	-	18/40	-	-	12
Tiroglobulina (humana): seleccionada em bovino	-	-	10/40	-	-	4
Fog1 (anticorpo IgG1, k humano)	-	-	-	94/96	-	4
TNF α (humano)	-	122/1920	83/192	92/96	-	7
CEA (humano)	-	-	0/96	1/96	2/96	1
MUC1 (humano): seleccionada com péptido	-	-	-	0/96	2/96	1
rsCD4 (humano)	-	-	-	-	8/96	1

As proporções indicam a frequência de clones de ligação após cada ronda de selecção. Os fagemídeos foram recuperados com fago auxiliar M13DgIII, excepto para as selecções CEA, MUC1 e rsCD4, onde se utilizou fago auxiliar VCS-M13.

Tabela II Família de gene V, derivação de linha germinal e extensão de hipermutação somática de vários fragmentos scFv específicos de antígeno isolados a partir da biblioteca não imunizada

scFv	Família	Gene de linha germinal de sequência de nucleótidos mais próxima	Diferenças da linha germinal	
			Nucleótido	Aminoácido
CADEIAS PESADAS				
αThy-23	VH3	DP-47	13	8
αThy-29	VH1	DP-14	0	0
αThy-32	VH3	DP-31	5	2
αThy-33	VH3	DP-49	32	19
αFOG1-A3	VH3	DP-54	7	3
αFOG1-A4	VH3	DP-46	7	7
αFOG1-H6	VH3	DP-51	10	4
αFOG1-G8 ^{a)}	VH4	DP-63 (FR1)	2	0
	VH5	DP-73 (CDR1 a FR3)	15	7
αTNF-A1	VH3	DP-50	9	6
αTNF-E1	VH3	DP-46	14	6
αTNF-E7	VH1	DP-10	0	0
αTNF-H9G1	VH1	DP-4	1	1
αCEA4-8A	VH1	DP-14	1	0
αMUC1-1 ^{a)}	VH1	VI-2 (FR1 a CDR2)	2	0
	VH1	DP-25 (FR3)	0	0
αCD4-74	VH5	DP-73	13	8
CADEIAS LEVES				
αThy-23	Vk1	L8	20	9
αThy-29	V 3	IGLV3S1	0	0
αThy-32	V 1	IGLV1S2	1	1
αThy-33 ^{a)}	Vk1	L12 (FR1 & CDR1)	6	3
	Vk4	B3 (FR2 a FR3)	5	5
αFOG1-A3-	V 2	VL2.1	16	9
αFOG1-A4	Vk1	04	25	12
αFOG1-H6	Vk1	L5	36	17
αFOG1-G8	Vk1	L8	27	14
αTNF-A1	Vk1	L11	12	8
αTNF-E1	Vk1	L5	5	5
αTNF-E7	Vk1	L11	17	8
αTNF-H9G1	V 1	IGLV1S2	18	9
αCEA4-8A	Vk1	02	4	0
αMUC1-1	V 2	VL2.1	18	12
αCD4-74	V 1	Humlv1L1	23	17

Referências para todos os genes de linha germinal de cadeia pesada podem ser encontradas em Tomlinson et al. (1992). As referências para as cadeias leves são VL2.1 (Brockly et al. 1989); IGLV1S2 (Bernard et al. 1990); IGLV3S1 (Frippiat et al. 1990); L8 (Vd) e L5 (Vb) (Pech et al., 1984); L12 (HK102) (Bentley e Rabbits, 1980); B3 (VKIV) (Klobeck et al., 1985); 02 e 04 (Pargent et al., 1991); L11 (Scott et al., 1991); Humlv1L1 (Daley et al., 1992). Nomes alternativos são indicados entre parênteses.

a) Estes genes parecem ter sido criados por cruzamentos entre dois genes V durante a amplificação por PCR e deste modo foram determinadas correspondências utilizando os dois segmentos de linha germinal putativos: FR, estrutura (*framework*); CDR, região determinante de complementaridade.

Bentley, D. L. e Rabbits, T. H. (1980) *Nature*, 288, 730-3.

Bernard, F., Chuchana, P., Frippiat, J. P., Buluwela, L. e Lefranc, M. P. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 7139.

Brockly, F., Alexandre, D., Chuchana, P., Huck, S., Lefranc, G. e Lefranc, M. P. (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17, 3976.

Frippiat, J. P., Chuchana, P., Bernard, F., Buluwela, L., Lefranc, G. e Lefranc, M.P. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 7134.

Klobeck, H. G. Bornkamm, G. W., Combriato, G., Mocikat, R., Pohlenz, H. D. e Zachau, H. G. (1985) *Nucleic Acids Res.*, 13, 6515-29.

Pargent, W., Meindl, A., Thiebe, R., Mitzel, S. e Zachau, H. G. (1991) *Eur. J. Immunol.*, 21, 1821-7.

Pech, M., Jaenichen, H. R., Pohlenz, H. D., Neumaier, P. S., Klobeck, H. G. e Zachau, (1984) *J. Mol. Biol.*, 176, 189-204.

Scott, M. G., Crimmins, D. L., McCourt, D. W., Chung, G., Schable, K. F., Thiebe, R., Quenzel, E. M., Zachau, H. G. e Nahm, M. H. (1991) *J. Immunol.*, 47, 4007-13.

Tomlinson, I. M. Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B. e Winter, G. (1992) *J. Mol. Biol.*, 227, para impressão.

Tabela III Afinidades e cinéticas de ligação de antígeno por fragmentos scFv monoméricos e diméricos

scFv	(M/D) ^{a)}	Espécie imobilizada	$k_{on}^{b)}$ (BIAcore) $M^{-1}s^{-1}/10^4$	$k_{off}^{b)}$ (BIAcore) $s^{-1}/10^{-2}$	$K_a =$ k_{on}/k_{off} (BIAcore) $M^{-1}/10^6$	K_a por FQ ^{c)} ou inibição ^{d)} $M^{-1}/10^6$
α TNF-E7:	D	TNF α humano	9,0 (\pm 1,2)	1,4 (0,054)	6,4	ND
α FOG1-H6	D	Fog-1 (directo)	22,2 (\pm 0,4)	1,8 (0,23)	12,3	ND
α FOG1-H6	D	Fog-1 (via RAMIgG1)	22,1 (\pm 1,9)	2,4 (0,045)	9,3	ND
α FOG1-H6	D	α FOG1-H6 scFv 104	(\pm 2,4)	ND ^{c)}	ND	ND
α FOG1-H6	M+D	(Medida por inibição)	ND	ND	ND	0,3 ^{d)}
α FOG1-A3	M+D	(Medida por inibição)	ND	ND	ND	0,6 ^{d)}
α Thy-29	D	Tiroglobulina humana	6,6 (\pm 1,2)	0,46 (0,063)	14,3	ND
α Thy-29	M	Tiroglobulina humana	ND	2,0 (0,37)	ND	ND
α TEL9	M	Lisozima de ovo de peru	39,2 (\pm 2,6)	1,0 (0,97)	39,2	11,6 ^{c)}

a) M, fracção monomérica: D, fracção dimérica b) Os números entre parênteses são desvios padrão c) FQ, titulação de extinção de fluorescência d) Calculado a partir da extensão de inibição da ligação de ^{125}I -Fog-1 ao antígeno Rh D e) Não determinada porque as curvas de dissociação tinham uma má curvatura.

Tabela IV Oligonucleótidos utilizados

SYNLIB1 :	5'GCC TCC ACC TCT CGA GAC GGT GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ATA GTC AAA (A/CNN)5 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'
SYNLIB2 :	5'GCC TCC ACC TCT CGA GAC GGT GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA (A/CNN)5 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'
SYNLIB4 :	5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)4 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'
SYNLIB5 :	5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)5 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'
SYNLIB6 :	5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)6 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB7 : 5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)7 TCT TGC
ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB8 : 5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)8 TCT TGC
ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB9 : 5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)9 TCT TGC
ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB10 : 5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)10 TCT TGC
ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB11 : 5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)11 TCT TGC
ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB12 : 5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)12 TCT TGC
ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

JHSAL : 5'- GCC TGA ACC GCC TCC ACC AGT CGA CAC GGT GAC
CAG GGT ACC TTG GCC CCA-3'

CDRFOR : 5'- CAG GGT ACC TTG GCC CCA-3'

CDRBACK : 5'- GTG TAT TAC TGT GCA AGA-3'

Iniciadores Back de VH Humano

HuVH1aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG
GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3'

HuVH2aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG
GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG-3'

HuVH3aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG
GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG-3'

HuVH4aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG
GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG-3'

HuVH5aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG
GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC-3'

HuVH6aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG
GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3'

Lisboa, 2008-12-10

REIVINDICAÇÕES

1. Método de obtenção de um membro de um par de ligação específica (membro de sbp), o membro de sbp sendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo compreendendo um domínio VH de anticorpo humano e um domínio VL de anticorpo humano formando um local de ligação ao antigénio com especificidade de ligação para um auto-antigénio humano, o método compreendendo:

(a) a preparação de uma biblioteca de sequências de ácido nucleico codificando uma população geneticamente diversificada dos referidos membros do par de ligação específica, onde a preparação da biblioteca compreende a preparação de uma população geneticamente diversificada de sequências codificando o domínio VH por recombinação artificial ou sintética de sequências de gene VH de linha germinal humana com segmentos D e J e incluindo bases aleatórias na região de junção V-D-J;

(b) a expressão da referida biblioteca de sequências de ácido nucleico em células hospedeiras recombinantes pela qual cada referido membro de par de ligação específica ou um seu componente de cadeia polipeptídica é expresso como uma fusão com um componente de superfície de proteína de revestimento de um bacteriófago filamentoso que exhibe na superfície de uma partícula bacteriofágica o referido membro de par de ligação específica, estando empacotada na referida partícula uma sequência de nucleótidos codificando uma referida fusão, pelo que o genoma da referida partícula exibindo um membro de ligação específica codifica o referido membro de par de ligação específica exibido ou um seu componente de cadeia polipeptídica;

(c) a selecção, por ligação com o referido auto-antigénio, de um ou mais membros de sbp com especificidade de ligação para com o referido auto-antigénio.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 onde a referida população geneticamente diversificada de sequências codificando o domínio VH é preparada por combinação de pelo menos cerca de 50 segmentos de gene VH de linha germinal humana com segmentos de gene DH e JH.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 onde a referida população geneticamente diversificada de sequências codificando o domínio VH é preparada por combinação de múltiplos segmentos de gene VH de linha germinal humana com

segmentos de gene DH e JH, onde os referidos múltiplos segmentos de gene VH de linha germinal humana estão afectados por tendências em relação a uma ou mais famílias de gene VH.

4. Método de acordo com a reivindicação 1 onde a preparação das referidas sequências codificando o domínio VH humano compreende a alteração de sequências de gene V de linha germinal.

5. Método de acordo com qualquer reivindicação precedente onde ambos os referidos domínios VH e VL são expressos a partir de ácido nucleico susceptível de ser empacotado utilizando o referido componente de um bacteriófago filamentosos.

6. Método de acordo com a reivindicação 5 onde cada referido membro de sbp exibido na superfície de um bacteriófago filamentosos é um fragmento de anticorpo scFv.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 onde cada referido membro de sbp exibido na superfície de um bacteriófago filamentosos é um fragmento de anticorpo Fab.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes onde os membros de sbp seleccionados em (c) exibidos na superfície de um bacteriófago filamentosos são seleccionados ou rastreados para proporcionar um bacteriófago filamentosos individual exibindo um membro de sbp ou uma população mista do referido bacteriófago filamentosos, com cada bacteriófago filamentosos contendo ácido nucleico codificando o membro de sbp ou uma sua cadeia polipeptídica que é exibido na sua superfície.

9. Método de acordo com a reivindicação 8 onde o ácido nucleico que codifica um membro de sbp seleccionado ou rastreado e que é obtido a partir de um bacteriófago filamentosos que exhibe na sua superfície um membro de sbp seleccionado ou rastreado, é utilizado para expressar um membro de sbp ou um seu fragmento ou derivado num hospedeiro recombinante.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes onde ácido nucleico de um ou mais bacteriófagos filamentosos é retirado e utilizado para proporcionar ácido nucleico de codificação num método adicional para obter um

membro de sbp individual ou uma população mista de membros de sbp, ou ácido nucleico codificando um referido membro de sbp individual ou uma referida população mista de membros de sbp.

11. Método de acordo com a reivindicação 9 ou a reivindicação 10 onde um produto final de expressão é modificado para produzir um seu derivado.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9, 10 e 11 onde o produto final de expressão ou seu derivado é utilizado para preparar um medicamento terapêutico ou profiláctico ou um produto de diagnóstico.

Lisboa, 2008-12-10

RESUMO

"Produção de auto-anticorpos a partir de reportórios de segmentos de anticorpo e exibidos em fagos"

São revelados métodos para a produção de auto-anticorpos e fragmentos de anticorpo, sendo os anticorpos ou fragmentos de uma espécie particular de mamífero que se ligam a auto-antígenos dessa espécie. Os métodos compreendem proporcionar uma biblioteca de pacotes de exibição genética replicáveis (rgdp, *replicable genetic display packages*), tais como fagos filamentosos, cada rgdp exibindo na sua superfície um membro de um par de ligação específica que é um anticorpo ou um fragmento de anticorpo, e cada rgdp contendo uma sequência de ácido nucleico obtida a partir de uma espécie de mamífero. A sequência de ácido nucleico em cada rgdp codifica uma cadeia polipeptídica que é uma parte componente do membro de sbp exibido na superfície desse rgdp. Fragmentos de auto-anticorpo são seleccionados por ligação com um auto-antígeno da referida espécie de mamífero. Os fragmentos de anticorpo exibidos podem ser scFv, Fd, Fab ou qualquer outro fragmento que tem a capacidade de se ligar a antígeno. As bibliotecas de ácido nucleico utilizadas podem ser obtidas a partir de sequências de gene V rearranjadas de um mamífero não imunizado. São descritas bibliotecas sintéticas ou artificiais e mostra-se a sua utilidade.

Fig.1.

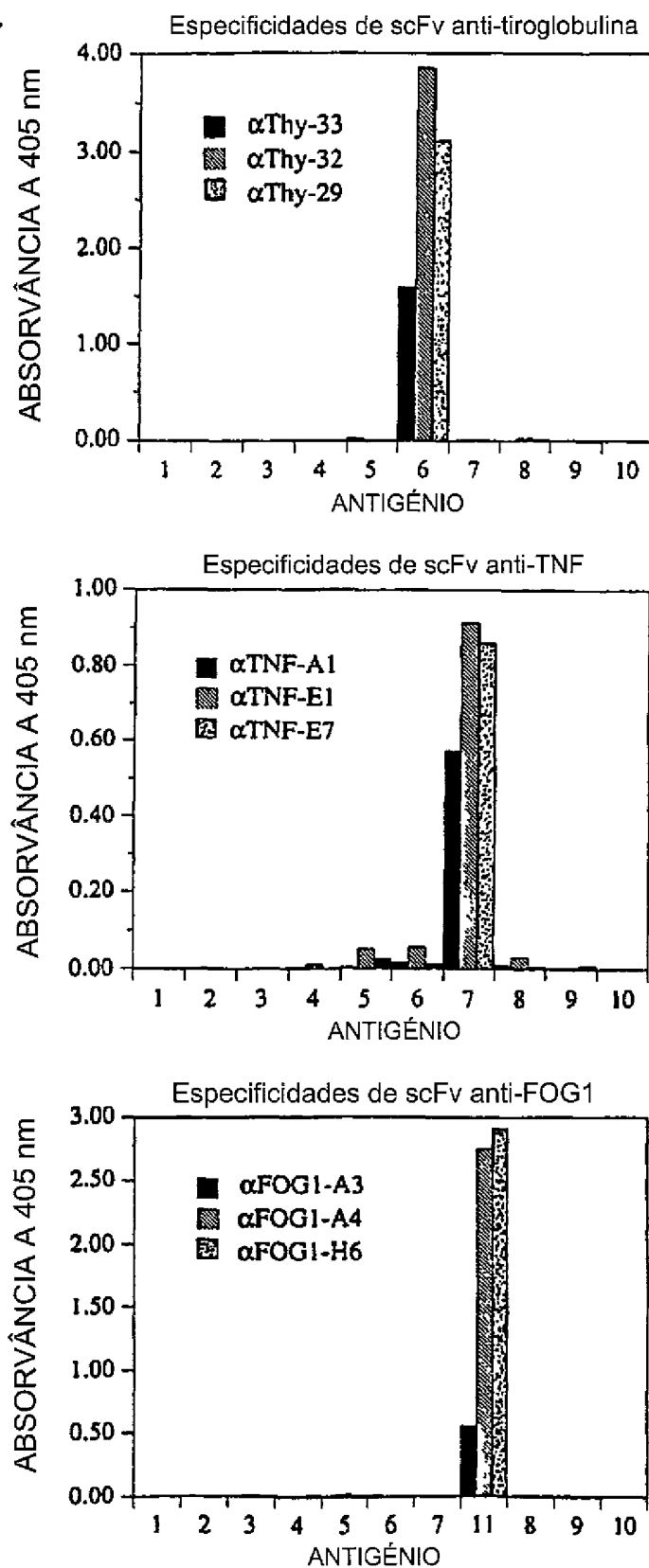


Fig.2.

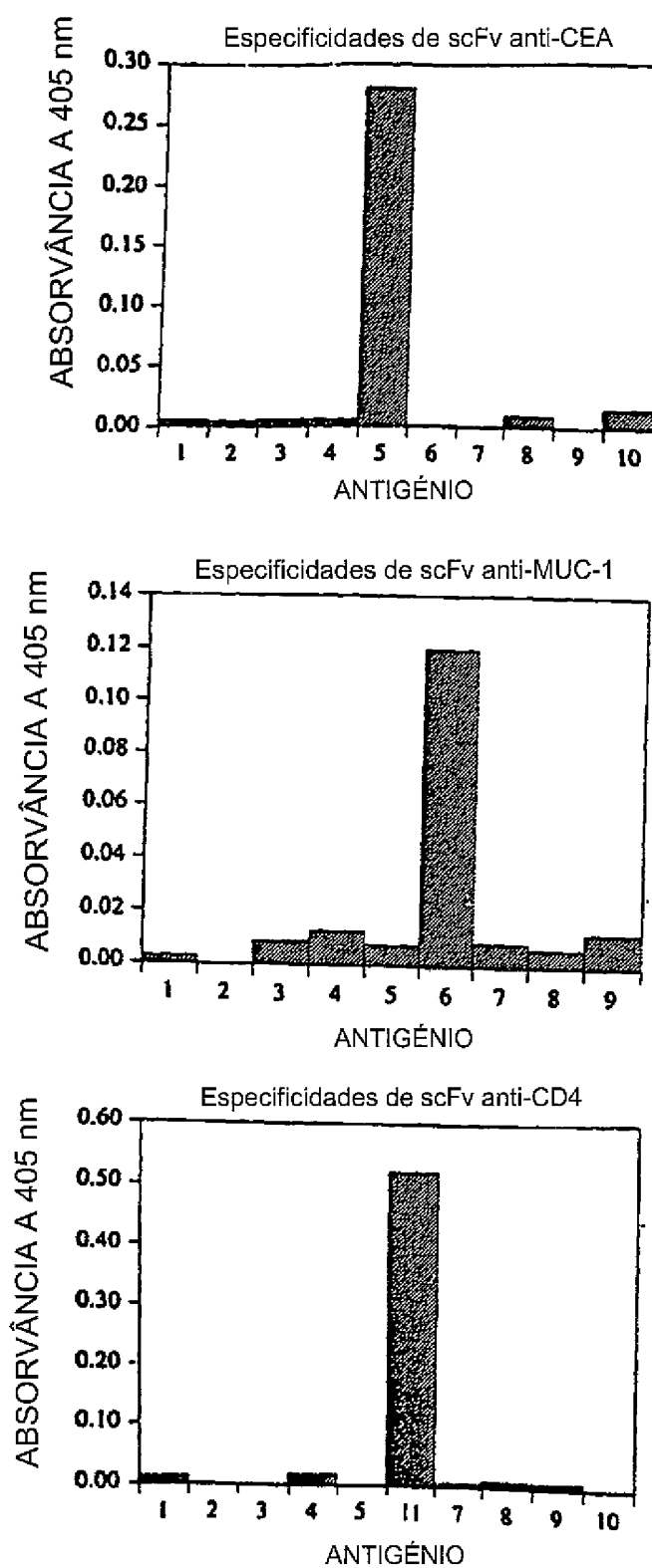


Fig.3.

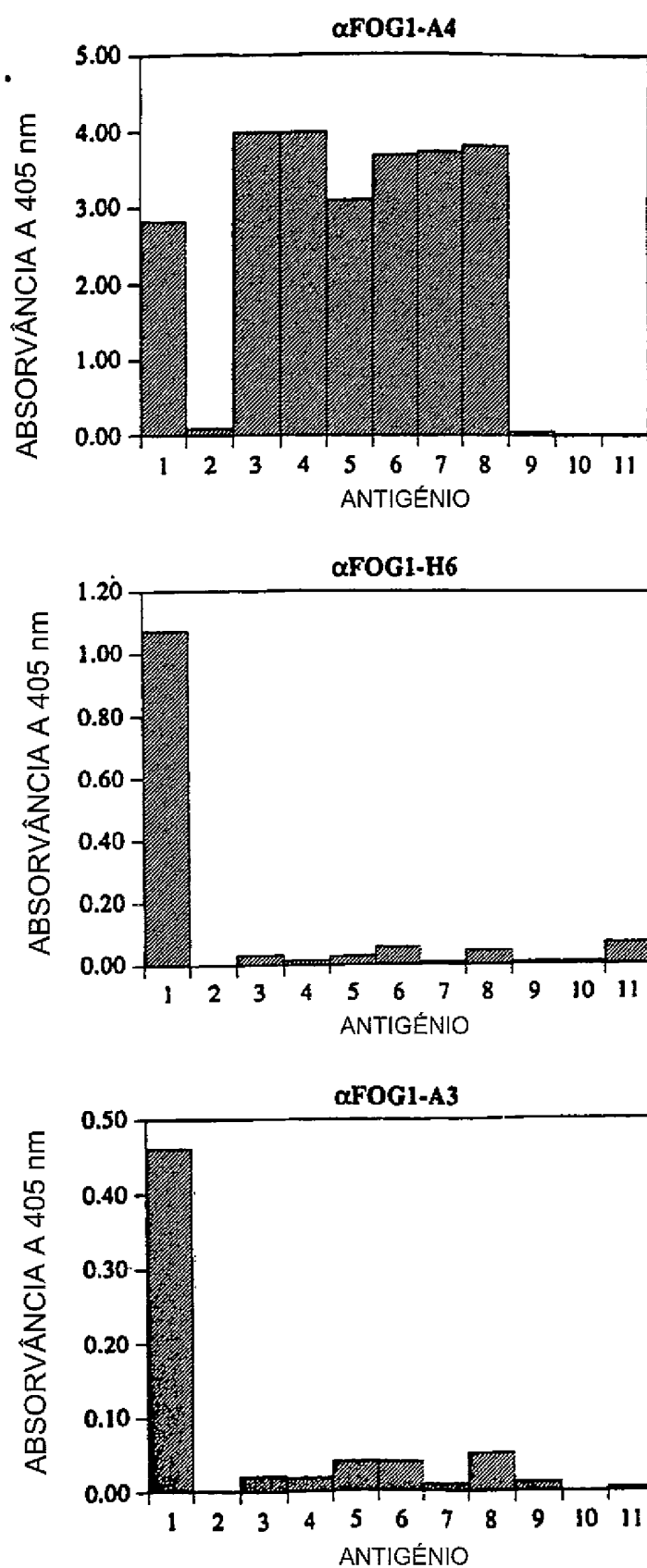


Fig. 4.

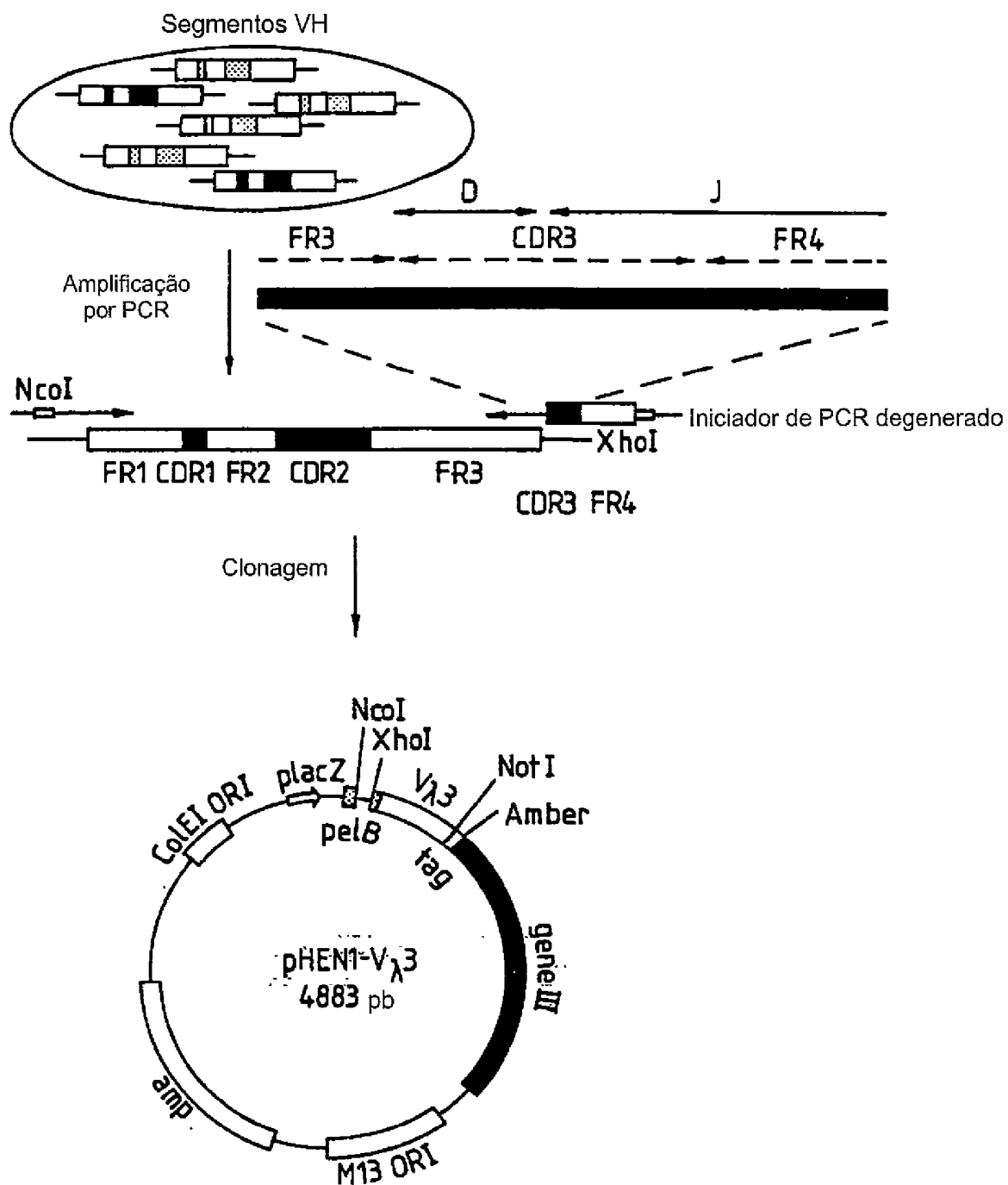


Fig. 5(i)

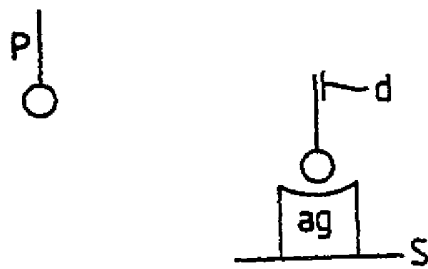


Fig. 5(ii)

