



República Federativa do Brasil
Ministério de Desenvolvimento, Indústria,
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) PI 0809042-4 A2



* B R P I O 8 0 9 0 4 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 21/03/2008
(43) Data da Publicação: 16/09/2014
(RPI 2280)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/28
A61K 39/395
C12N 15/13
C12N 15/63

(54) Título: PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO, ANTICORPOS, (57) Resumo:
FRAGMENTOS DE ANTICORPOS, MOLÉCULAS DE
ÁCIDO NUCLÉICO E DE DNA, VETOR, CÉLULA
HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS
DOS MESMOS

(30) Prioridade Unionista: 22/03/2007 US 60/919,816,
22/03/2007 US 60/919,938, 27/03/2007 US 60/920,495

(73) Titular(es): Biogen Idec Ma Inc, UCB PHARMA SA

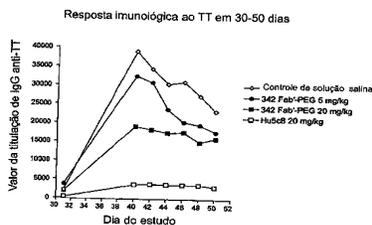
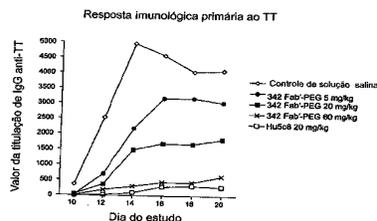
(72) Inventor(es): Andrew George Popplewell, Anthony Shock,
Derek Thomas Brown, Ellen A. Garber, Frederick R. Taylor, JANINE L.
FERRANT-ORGETTAS, Kerry Louise Tyson, Lihe Su, Linda C. Burkly,
Martyn Kim Robinson, Ralph Adams, Yen-Ming Hsu

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008003735 de
21/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/118356de
02/10/2008

Inibição da resposta imunológica de IgG
ao toxóide tetânico em macacos Cynomolgus



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO, ANTICORPOS, FRAGMENTOS DE ANTICORPOS, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO E DE DNA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS DOS MESMOS**".

5 Este pedido reivindica prioridade pelo Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 60/920.495, depositado em 27 de março de 2007, Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 60/919.938, depositado em 22 de março de 2007, e Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 60/919.816, depositado em 22 de março de 2007. Os conteúdos das Patentes U.S. 60/920.495, U.S.
10 60/919.938 e U.S. 60/919.816 são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a proteínas de ligação, incluindo anticorpos, derivados de anticorpos e fragmentos de anticorpos, que se li-
15 gam especificamente a uma proteína CD154 (CD40L). Esta invenção também fornece um anticorpo quimérico, humanizado ou totalmente humano, derivado de anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente a um epítopo ao qual um fragmento Fab humanizado que compreende a se-
quência de cadeia pesada variável de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que
20 compreende uma sequência de cadeia leve variável de acordo com a SEQ ID NO: 2 se liga especificamente. As proteínas de ligação de CD154 desta invenção podem despertar uma função efetora reduzida em relação a um segundo anticorpo anti-CD154. As proteínas de ligação de CD154 desta in-
venção são úteis em métodos diagnósticos e terapêuticos como, por exem-
25 plo, no tratamento e prevenção de doenças que incluem aquelas que envolvem respostas imunológicas indesejáveis que são mediadas por interações CD154-CD40.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A geração de imunidade humoral e mediada por células é or-
30 questrada pela interação de células T auxiliares (*helper*) ativadas com células apresentadoras de antígeno ("APCs") e células T efetoras. A ativação das células T auxiliares não depende apenas da interação do receptor de

célula T antígeno-específico ("TCR") com seu ligante de peptídeo-MHC cognato, mas também necessita da ligação e ativação coordenadas por diversas moléculas de adesão celular e coestimuladoras. Vide, por exemplo, Salazar-Fontana, L.I. e B.E. Bierer (2001) *Curr. Opin. Hemat.* 8: 5.

5 Uma molécula coestimuladora crucial é CD154, uma proteína transmembrana do Tipo II que é expressa na superfície de células T CD4⁺ de uma forma ativação-dependente, temporalmente-restrita. CD154 também é expressa, após ativação, em um subconjunto de células T CD8⁺, basófilos, mastócitos, eosinófilos, células *natural killer*, células B, macrófagos, células
10 dendríticas e plaquetas. O contrarreceptor de CD154, CD40, é uma proteína da membrana do Tipo I que é constitutiva e amplamente expressa na superfície de muitos tipos de célula, incluindo APCs. Vide, por exemplo, Foy, T. M. e outros (1996) *Ann. Rev. Immunol.* 14: 591.

A sinalização por meio de CD40 por CD154 inicia uma cascata
15 de eventos que resulta na ativação das células que abrigam o receptor de CD40 e na sensibilização ótima de células T CD4⁺. Mais especificamente, a ligação de CD154 a CD40 promove a diferenciação de células B em células que secretam anticorpo e células B de memória. Vide, por exemplo, Burkly, L.C. (2001) *In Adv. Exp. Med. Bio.*, Vol. 489. D.M. Monroe e outros eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, página 135 (daqui por diante "Burkly, *supra*").
20 Adicionalmente, a interação CD154-CD40 promove a imunidade mediada por células por meio da ativação de macrófagos e de células dendríticas e a geração de células *natural killer* e linfócitos T citotóxicos. Vide, por exemplo, Burkly, *ibid.*

25 O papel crucial de CD154 na regulação da função tanto da resposta imunológica humoral quanto da resposta imunológica mediada por células provocou grande interesse no uso de inibidores dessa via para imunomodulação terapêutica. Dessa forma, anticorpos anti-CD154 demonstraram ser benéficos em uma ampla gama de modelos de respostas imunológicas para outras proteínas terapêuticas ou terapia gênica, alérgenos autoimunidade e transplante. Vide, por exemplo, U.S. 5.474.771; Burkly, *supra*.
30

A interação CD40-CD154 demonstrou ser importante em várias

doenças autoimunes induzidas experimentalmente, nas quais foi demonstrado que a indução da doença pode ser bloqueada com antagonistas de CD154 no momento da administração de antígeno (Burkly, *supra*). O bloqueio de doença usando antagonistas anti-CD154 também foi observado em
5 modelos animais de doença autoimune espontânea. Vide, por exemplo, Burkly, *supra*.

Há atualmente uma necessidade de anticorpos anti-CD154 aprimorados com afinidades de ligação mais elevadas e menos efeitos colaterais indesejados. "Funções efetoras" aumentadas, tais como citotoxicidade
10 direta, citotoxicidade dependente de complemento ("CDC"), citotoxicidade anticorpo-dependente ("ADCC") e produção anormal de anticorpo, são efeitos colaterais indesejados que podem estar associados aos anticorpos terapêuticos.

Várias funções efetoras de anticorpo são mediadas, pelo menos
15 em parte, por receptores Fc (FcRs), que se ligam à região Fc de um anticorpo no domínio constante de uma imunoglobulina típica. Há inúmeros receptores Fc que são específicos para as diferentes classes de imunoglobulinas. As classes de imunoglobulinas incluem IgG, IgE, IgA, IgM e IgD. As classes de imunoglobulinas são ainda divididas em subclasses: IgG é dividida em
20 quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), e IgA é dividida em duas subclasses (IgA1 e IgA2). Há três receptores conhecidos para IgG: Fc γ R1 (CD64), Fc γ R2 (CD32) e Fc γ R3 (CD16). Cada subclasse Fc γ R é codificada por dois ou três genes, e o *splicing* alternativo de RNA leva a múltiplos transcritos e a uma diversidade ampla em isoformas de Fc γ R.

25 Tipicamente, as imunoglobulinas são moléculas na forma "Y" que compreendem duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Ligações dissulfeto unem em conjunto os pares de cadeia pesada e leve, além das duas cadeias pesadas. Cada cadeia consiste em um domínio variável que varia em termos de sequência e é responsável pela ligação
30 de antígeno; esses domínios são conhecidos como os domínios V_H e V_L para as cadeias pesadas e leves, respectivamente. Na cadeia leve, há um único domínio constante (C_L), e na cadeia pesada há três domínios constantes

(CH₁, CH₂ e CH₃). As moléculas que contêm todos os domínios variáveis e constantes podem ser denominadas anticorpos inteiros.

Os resíduos em domínios variáveis de anticorpo são convencionalmente numerados de acordo com um sistema desenvolvido por Kabat e outros. Esse sistema é apresentado em Kabat e outros, 1987, em "Sequences of Proteins of Immunological Interest", "U.S. Department of Health and Human Services", NIH, USA (daqui por diante "Kabat e outros, *supra*"). Esse sistema de numeração é usado no presente relatório descritivo, exceto quando indicado de forma diferente. Deve-se observar que as designações de resíduos de Kabat nem sempre correspondem diretamente à numeração linear dos resíduos de aminoácidos. A sequência de aminoácidos linear real pode conter menos ou mais aminoácidos do que na numeração rígida de Kabat, correspondendo a um encurtamento de, ou inserção em, um componente estrutural, seja uma região de estrutura (*framework*) ou uma região determinante de complementaridade (CDR), da estrutura básica do domínio variável. A numeração de Kabat correta de resíduos pode ser determinada para certo anticorpo por alinhamento de resíduos de homologia na sequência do anticorpo com uma sequência "padrão" numerada por Kabat.

Há três regiões dentro dos domínios variáveis que são hipervariáveis em conjunto de sequências dentro das quatro regiões de estrutura mais altamente conservadas. Essas CDRs hipervariáveis são primariamente responsáveis por reconhecimento de antígeno. As CDRs do domínio variável da cadeia pesada estão localizadas nos resíduos 31-35 (CDR-H1), nos resíduos 50-65 (CDR-H2) e nos resíduos 95-102 (CDR-H3) de acordo com o sistema de numeração de Kabat. No entanto, de acordo com Chothia (Chothia, C. e Lesk, A.M. *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-917), a alça equivalente à CDR-H1 se estende do resíduo 26 ao resíduo 32. Dessa forma, "CDR-H1", como aqui usado, também inclui uma CDR localizada nos resíduos 26 a 35, como descrito por uma combinação do sistema de numeração de Kabat e com a definição de alça topológica de Chothia. As CDRs do domínio variável da cadeia leve estão localizadas nos resíduos 24-34 (CDR-L1), resíduos 50-56 (CDR-L2) e resíduos 89-97 (CDR-L3), de acordo com o sistema de nume-

ração de Kabat.

Embora anticorpos de ocorrência natural, como anticorpos inteiros ou como fragmentos que retêm propriedades de ligação específicas, fossem originalmente derivados de uma única espécie, anticorpos produzidos por engenharia genética podem ser derivados de mais de uma espécie de animal, por exemplo, anticorpos quiméricos. Até hoje, foram gerados principalmente anticorpos de camundongo (murinos)/humanos quiméricos e murinos/primata não-humano, embora outras combinações híbridas de espécies sejam possíveis. Muitas configurações diferentes de polipeptídeos de anticorpo de ocorrência natural e produzido por engenharia genética, e derivados e fragmentos dos mesmos, são agora conhecidas. A característica comum a todas é que o polipeptídeo ou os polipeptídeos retêm especificidade de ligação de antígeno por meio de um ou mais domínios de ligação de epitopo. Além da ligação de epitopo, as propriedades funcionais de um polipeptídeo de anticorpo podem diferir, dependendo de quais outras sequências estão presentes, por exemplo, domínios Fc ou outras sequências que ativam funções efetoras e/ou interagem com outras vias celulares.

As proteínas de ligação de CD154 que compreendem domínios de ligação de epitopo (por exemplo, CDRs ou domínios variáveis) incorporados em uma estrutura de não-imunoglobulina (vide, por exemplo, Binz e outros 2005 *Nat. Biotech.* 23: 1.257-1.268; Hosse e outros 2006 *Protein Science* 15: 14-27) podem exibir funções efetoras reduzidas. Seria desejável ter novas proteínas de ligação que antagonizem especificamente a ligação de CD154 a CD40 e reduzam ou eliminem funções a jusante do complexo CD154-CD40. Também seria desejável ter proteínas de ligação de CD154 como, por exemplo, anticorpos anti-CD154, com funções efetoras reduzidas comparados com anticorpos anti-CD154 conhecidos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece uma solução para esses e outros problemas pelo fornecimento de uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo isolado, recombinante ou sintético, ou fragmento ou derivado do mesmo, que se liga especificamente a uma proteína CD154, que pode ser

uma proteína CD154 humana. Os anticorpos anti-CD154 da invenção, incluindo fragmentos e derivados dos mesmos, podem ser anticorpos monoclonais, policlonais, murinos, quiméricos, sensibilizados, humanizados ou totalmente humanos. Os anticorpos anti-CD154 da invenção podem ser multiméricos, heterodiméricos, hemidiméricos, monovalentes, bivalentes, tetravalentes, biespecíficos, e podem incluir anticorpos de cadeia única; e derivados dos mesmos.

Em certas modalidades, as proteínas de ligação de CD154, por exemplo, os anticorpos anti-CD154, da presente invenção, possuem alta seletividade por CD154 e, em algumas modalidades, também possuem uma ou mais funções efetoras reduzidas comparadas, por exemplo, com o anticorpo anti-CD154 5c8 (produzido pelo hibridoma depositado sob Nº de Acesso na ATCC HB 10916, como descrito na Patente U.S. 5.474.771; ou 5c8 humanizado). Algumas das proteínas de ligação de CD154, por exemplo, os anticorpos anti-CD154, da invenção são monovalentes para a ligação de CD154.

As proteínas de ligação de CD154 e os anticorpos anti-CD154 (incluindo fragmentos e derivados de anticorpos) da invenção são úteis para inibição da ligação de CD154 a CD40 e o fazem com alta especificidade, por exemplo, com uma IC_{50} na faixa de 20 pM a 1,5 μ M, inclusive. Em certas modalidades, as proteínas de ligação de CD154, por exemplo, os anticorpos anti-CD154, da invenção podem ter uma IC_{50} na faixa de 20 pm a 500 pm, 50 pm a 500 pm, ou 100 pm a 500 pm. Em certas modalidades, as proteínas de ligação de CD154 e os anticorpos anti-CD154 (incluindo fragmentos e derivados de anticorpos) da invenção não agonizam substancialmente a atividade de CD40.

Certas modalidades da presente invenção estão relacionadas às proteínas de ligação de CD154, por exemplo, anticorpos anti-CD154, que exibem uma alta afinidade por CD154 humano. Por exemplo, em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, se dissocia do CD154 humano (CD40L humano) com uma K_D na faixa de 50 nM a 1 pM, inclusive, como determinado por ressonância de

plasmônio de superfície (por exemplo, Biacore®). Por exemplo, a K_D para CD154 humano pode ser de 50 pM a 1 pM, 20 pM a 1 pM, ou até mesmo 10 pM a 1 pM. Em algumas modalidades, a K_D para CD154 humano é de menos de 20 pM. Em outras modalidades, a K_D para CD154 humano é de menos de 10 pM.

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, que, quando presente em concentrações de saturação ou acima delas para ligação de CD154 com base em sua afinidade de ligação, é capaz de bloquear a ligação do anticorpo 5c8 ao CD154 quando adicionada ao CD154 primeiro, e também é capaz de deslocar o anticorpo 5c8 ligado ao CD154 quando adicionada depois de o anticorpo 5c8 ser adicionado ao CD154.

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a uma proteína CD154 e que compreende ou consiste em uma ou mais sequências da cadeia pesada (H) da CDR selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 5). Em modalidades adicionais, a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consiste em pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 5). Ainda em modalidades adicionais, a proteína de ligação ou o anticorpo compreende ou consiste em todas as três sequências H da CDR, que são a CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), a CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) e a CDR-H3 (SEQ ID NO: 5).

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a uma proteína CD154 e que compreende ou consiste em uma ou mais sequências da cadeia leve (L) da CDR selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 8). Em modalidades adicionais, a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consiste em pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 8). Ainda em modalidades adicionais, a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consis-

te em todas as três sequências L da CDR, que são CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 8).

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a uma proteína CD154 e que compreende ou consiste em CDR-L1 (SEQ ID NO: 6),
5 CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 8), e em que a proteína de ligação ou o anticorpo ainda compreende ou consiste em CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 5).

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de
10 ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consiste em uma sequência V_H selecionada da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11. Em certas outras modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consiste em uma
15 sequência da cadeia pesada selecionada da SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de
20 ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consiste em uma sequência V_L selecionada da SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 14. Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a
25 uma proteína CD154, em que a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consiste na sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15.

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de
ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consiste em uma sequência V_L selecionada da SEQ ID NO: 2 e
30 SEQ ID NO: 14, e uma sequência V_H selecionada da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11. Em certas modalidades, esta in-

venção fornece uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consiste em uma sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e uma sequência da cadeia pesada selecionada da SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13. Em outras modalidades, a proteína de ligação de CD154 ou anticorpo compreende ou consiste em uma sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e uma sequência da cadeia pesada da SEQ ID NO: 13.

Em outras modalidades, a presente invenção está relacionada a uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente ao CD154, e compreende ou consiste em uma ou mais sequências de CDR de cadeia pesada (H) selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 44). Em modalidades adicionais, a proteína de ligação ou o anticorpo compreende ou consiste em pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 44). Ainda em modalidades adicionais, a proteína de ligação ou o anticorpo compreende ou consiste em todas as três sequências H da CDR, que são CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) e a CDR-H3 (SEQ ID NO: 44).

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que a proteína de ligação ou o anticorpo compreende ou consiste em uma ou mais sequências de cadeia leve (L) da CDR selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 47). Em modalidades adicionais, a proteína de ligação ou o anticorpo compreende ou consiste em pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 47). Ainda em modalidades adicionais, a proteína de ligação ou o anticorpo compreende ou consiste em todas as três sequências L da CDR, que são CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 47).

Em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154 ou um anticorpo anti-CD154 da presente invenção compreende uma sequência

complementar que compreende ou consiste em uma ou mais CDRs da cadeia leve de CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, acima, ou uma sequência complementar que compreende ou consiste em uma ou mais CDRs da cadeia pesada de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, acima, respectivamente. Dessa forma, em certas modalidades, uma proteína de ligação ou um anticorpo desta invenção compreende ou consiste em CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) ou CDR-H3 (SEQ ID NO: 44), e CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) ou CDR-L3 (SEQ ID NO: 47).

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, em que a proteína de ligação ou o anticorpo compreende ou consiste nas seguintes três sequências L da CDR: CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 47), e em que a proteína de ligação ou o anticorpo ainda compreende ou consiste nas seguintes três sequências H da CDR: CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 44).

Em modalidades adicionais, esta invenção fornece uma proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente ao CD154 e que compreende ou consiste em uma sequência da cadeia leve variável (V_L) da SEQ ID NO: 54. A invenção também está relacionada a uma proteína de ligação de CD154 ou um anticorpo anti-CD154 que compreende ou consiste em uma sequência da cadeia pesada variável (V_H) da SEQ ID NO: 56. Em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154 ou um anticorpo anti-CD154 da invenção pode compreender ou consistir tanto em uma sequência V_L da SEQ ID NO: 54 quanto em uma sequência V_H da SEQ ID NO: 56.

Em outras modalidades, a presente invenção está relacionada a uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, que se liga especificamente ao CD154, em que a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo anti-CD154 compreende ou consiste em uma ou mais sequências de CDR de cadeia pesada (H) selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50). Em mo-

dalidades adicionais, a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo anti-CD154 compreende ou consiste em pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50). Ainda em modalidades adicionais, a proteína de ligação de CD154
5 ou o anticorpo anti-CD154 compreende ou consiste em todas as três sequências H da CDR, que são CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50).

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que a proteína de ligação de CD154
10 ou o anticorpo anti-CD154 compreende ou consiste em uma ou mais sequências de cadeia leve (L) da CDR selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 53). Em modalidades adicionais, a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo anti-CD154 compreende ou consiste em pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-L1
15 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 53). Ainda em modalidades adicionais, a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo anti-CD154 compreende ou consiste em todas as três sequências L da CDR, que são CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-
20 L3 (SEQ ID NO: 53).

Em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154 da presente invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, compreende uma sequência complementar que compreende ou consiste em uma ou mais CDRs da cadeia leve de CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, acima, ou uma se-
25 quência complementar que compreende ou consiste em uma ou mais CDRs da cadeia pesada de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, acima, respectivamente. Dessa forma, em certas modalidades, um anticorpo desta invenção compreende ou consiste em uma CDR H selecionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50), ou uma CDR L selecionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-L3
30 (SEQ ID NO: 53).

Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de

ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, em que a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo anti-CD154 compreende ou consiste em todas as três sequências L da CDR, que são CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 53), e em que a proteína de ligação, por exemplo, anticorpo, ainda compreende ou consiste em todas as três sequências H da CDR, que são: CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50).

Em modalidades adicionais, esta invenção fornece uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, que se liga especificamente ao CD154, em que a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo anti-CD154 compreende ou consiste em uma sequência V_L da SEQ ID NO: 58. Em modalidades adicionais, o anticorpo compreende ou consiste em uma sequência V_H da SEQ ID NO: 60. Em modalidades adicionais, o anticorpo compreende ou consiste em uma sequência V_H da SEQ ID NO: 60 e uma sequência V_L da SEQ ID NO: 58.

Em certas modalidades, a proteína de ligação de CD154 desta invenção compreende uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 62 e uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 65. Em outras modalidades, a proteína de ligação de CD154 desta invenção compreende uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 63 e uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 66.

Em certas modalidades, a proteína de ligação de CD154 desta invenção compreende uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 68 e uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 71. Em outras modalidades, a proteína de ligação de CD154 desta invenção compreende uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 69 e uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 72. Em outras modalidades, a proteína de ligação de CD154 compreende pelo menos uma das sequências de acordo com a SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 e SEQ ID NO: 72.

As sequências da CDR das SEQ ID NOS: 3-8 são derivadas do anticorpo monoclonal de rato 342. Em uma modalidade alternativa da invenção

ção, o anticorpo anti-CD154 é o anticorpo de rato 342 que compreende a sequência do domínio V_H da SEQ ID NO: 29 e a sequência do domínio V_L da SEQ ID NO: 30. A invenção também fornece uma molécula de DNA isolada, recombinante ou sintética que compreende ou consiste em pelo menos uma
5 sequência selecionada da SEQ ID NO: 31 e SEQ ID NO: 32. É adicionalmente fornecido um vetor que compreende pelo menos uma sequência selecionada da SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 34.

A invenção também fornece proteínas de ligação de CD154, por exemplo, anticorpos anti-CD154, que se ligam seletivamente ao mesmo epitopo que qualquer um dos anticorpos anti-CD154 aqui descritos (por exemplo, anticorpos 342, 381 e 338 e sequências de ligação de epitopo dos mesmos). Em particular, os anticorpos 342 e 338 da presente invenção exibem propriedades de ligação de CD154 similares, quando usados como primeiros ou segundos anticorpos em ensaios de competição com o anticorpo
10 anti-CD154 5c8, como aqui descrito.

Dessa forma, em certas modalidades, a invenção fornece proteínas de ligação de CD154 e anticorpos anti-CD154 que se ligam ao mesmo epitopo que um anticorpo humanizado que compreende uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13 e que
20 compreende uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 15 (fragmentos Fab e Fab' de 342), e que exibem propriedades de ligação de CD154 similares, quando usados como primeiros ou segundos anticorpos em ensaios de competição com o anticorpo anti-CD154 5c8, como aqui descrito. Em outras modalidades, a invenção fornece proteínas de ligação de
25 CD154 e anticorpos anti-CD154 que se ligam ao mesmo epitopo que um anticorpo humanizado que compreende uma sequência do domínio V_L de acordo com a SEQ ID NO: 58 e uma sequência do domínio V_H de acordo com a SEQ ID NO: 60 (sequências variáveis do anticorpo 338), e que exibem propriedades de ligação de CD154 similares em ensaios de competição
30 às do anticorpo anti-CD154 5c8, como aqui descrito.

Em qualquer uma das modalidades acima em relação a uma proteína de ligação de CD154 da invenção, a proteína de ligação pode ser

PEGuilada. Em modalidades nas quais a proteína de ligação de CD154 é um anticorpo anti-CD154, polipeptídeo de anticorpo ou fragmento ou derivado dos mesmo, o anticorpo pode ser PEGuilado na cadeia pesada, na cadeia leve ou em ambas as cadeias.

5 A presente invenção também fornece uma molécula de DNA isolada, recombinante e/ou sintética que compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada da SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 25.

10 Em certas modalidades, esta invenção também fornece uma molécula de DNA isolada, recombinante e/ou sintética que compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada da SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 70 e SEQ ID NO: 73.

15 Em outras modalidades, a invenção fornece uma molécula de DNA isolada, recombinante e/ou sintética que compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada da SEQ ID NO: 28 e SEQ ID NO: 41.

20 Esta invenção também fornece um vetor que compreende qualquer uma das moléculas de DNA isoladas, recombinantes e/ou sintéticas desta invenção. Em uma modalidade, o vetor compreende pelo menos uma sequência selecionada da SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 e SEQ ID NO: 41.

25 Em modalidades adicionais, esta invenção fornece uma molécula de DNA isolada, recombinante e/ou sintética que compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada da SEQ ID NO: 55 e SEQ ID NO: 57. Em algumas modalidades, a invenção fornece uma molécula de DNA isolada, recombinante e/ou sintética que compreende ou consiste tanto na SEQ ID NO: 55 quanto na SEQ ID NO: 57.

30 Em modalidades adicionais, esta invenção fornece uma molécula de DNA isolada, recombinante e/ou sintética que compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada da SEQ ID NO: 59 e SEQ ID

NO: 61. Em algumas modalidades, a invenção fornece uma molécula de DNA isolada, recombinante e/ou sintética que compreende ou consiste tanto na SEQ ID NO: 59 quanto na SEQ ID NO: 61.

5 Em qualquer uma das modalidades da invenção relacionadas às proteínas de ligação de CD154 e aos anticorpos anti-CD154 que compreendem sequências que contribuem para funções efetoras, as referidas proteínas de ligação ou anticorpos anti-CD154 podem adicionalmente ser selecionadas ou projetadas para despertar função efetora reduzida, comparada com um anticorpo anti-CD154 que possui uma região Fc, como aqui descrito em outra seção neste relatório descritivo. Por exemplo, as proteínas de ligação de CD154 e os anticorpos anti-CD154 que não possuem uma região Fc ou sequências da região constante, ou que não possuem uma região Fc funcional ou sequências da região constante, podem ser selecionadas para uso na invenção.

15 Em certas modalidades, as proteínas de ligação de CD154 e os anticorpos anti-CD154 da invenção são monovalentes para a ligação ao CD154 e, de preferência, despertam funções efetoras reduzidas quando administradas a um indivíduo em relação a uma proteína de ligação de CD154 comparável como, por exemplo, um anticorpo anti-CD154 bivalente.

20 Em certas outras modalidades, sequências da região Fc ou constante, se presentes em uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um polipeptídeo do anticorpo anti-CD154, podem ser selecionadas ou projetadas para compreender uma ou mais modificações (por exemplo, substituições, inserções, adutos ou eliminações de aminoácidos) que reduzem ou eliminam uma ou mais funções efetoras em relação a um anticorpo anti-CD154 de controle que compreende sequências da região Fc ou constante nativas, parentais ou não-modificadas.

25 Em algumas modalidades da invenção, uma região Fc, quando presente, é uma região Fc de, ou derivada de, um anticorpo IgG1, IgG2, 30 IgG3 ou IgG4. Em algumas modalidades, podem ser usadas regiões Fc híbridas, isto é, sequências de Fc híbridas de IgG1/IgG4. Em modalidades particulares, a região Fc compreende sequências de Fc de IgG4, ou é derivada

de um anticorpo IgG4. Deve-se entender que qualquer combinação híbrida entre regiões Fc diferentes que reduza uma ou mais funções efectoras pode ser usada de acordo com a invenção.

Em certas outras modalidades, a glicosilação da porção Fc de um anticorpo é reduzida ou eliminada, ou o perfil de glicosilação do anticorpo é alterado, como aqui descrito posteriormente. Em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154 ou um polipeptídeo do anticorpo anti-CD154 compreende um domínio CH₂ com uma região Fc que possui uma modificação no sítio de glicosilação ligada ao N conservado ou próximo a ele. A modificação no sítio de glicosilação ligada ao N conservado pode compreender uma mutação no sítio de glicosilação da cadeia pesada ou próximo a ele, em que a mutação reduz, altera ou evita a glicosilação no sítio. Em modalidades adicionais, a modificação compreende a mutação N298Q (N297 com o uso da numeração EU de Kabat). Em certas modalidades, a modificação compreende a remoção de glicanos do domínio CH₂ ou porções do mesmo. Em certas modalidades alternativas, a modificação evita a formação de um N-glicano maduro no sítio de glicosilação.

Em algumas modalidades, a presente invenção está relacionada a uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, que compreende uma sequência da CDR3 da cadeia pesada selecionada das SEQ ID NOS: 5, 44 e 50, e uma região Fc variante, a região Fc variante compreendendo um primeiro resíduo de aminoácido e um sítio de N-glicosilação, o primeiro resíduo de aminoácido modificado com química da cadeia lateral ou por substituição de aminoácido para se obter volume estérico aumentado ou carga eletrostática aumentada, comparado com o primeiro resíduo de aminoácido não-modificado, reduzindo, dessa forma, o nível ou, de alguma outra forma, alterando a glicosilação no sítio de N-glicosilação. Em algumas dessas modalidades, a região Fc variante confere função efectora reduzida, comparada com um controle, região Fc não-variante.

Em certas modalidades, a invenção está relacionada a uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, que compreende uma sequência da CDR3 da cadeia pesada selecionada das

SEQ ID NOS: 5, 44 e 50, e uma região Fc variante, a região Fc variante compreendendo um primeiro resíduo de aminoácido e um sítio de N-glicosilação, o primeiro resíduo de aminoácido compreendendo uma cisteína tiol, reduzindo, dessa forma, o nível ou alterando a glicosilação no sítio de N-glicosilação, em que a região Fc variante confere função efetora reduzida.

Em certas modalidades, o primeiro resíduo de aminoácido e o sítio de N-glicosilação dos anticorpos anti-CD154 que compreendem regiões Fc variantes descritas acima estão próximos ou dentro de um motivo de glicosilação ligada ao N. Em modalidades adicionais, o motivo de glicosilação ligada ao N compreende a sequência de aminoácidos NXT ou NXS. Em certas modalidades, o motivo de glicosilação ligada ao N compreende a sequência de aminoácidos NXT. Em certas modalidades, o sítio de N-glicosilação está localizado no aminoácido 297 de acordo com o sistema de numeração de Kabat. Em modalidades adicionais, o primeiro resíduo de aminoácido modificado é o aminoácido 299 de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

Em algumas das modalidades acima, a função efetora reduzida exibida por qualquer um dos anticorpos ou fragmento de anticorpo que contém proteínas de ligação aqui descritas é ligação reduzida a um receptor Fc (FcR). Em certas modalidades, o receptor Fc (FcR) é selecionado de Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII, e um ou mais subtipos dos mesmos como, por exemplo, Fc γ RIIa. Em algumas modalidades, a ligação de FcR é reduzida por um fator de pelo menos cerca de 1,5 vez ou mais, cerca de 2 vezes ou mais, cerca de 3 vezes ou mais, cerca de 4 vezes ou mais, cerca de 5 vezes ou mais, cerca de 6 vezes ou mais, cerca de 7 vezes ou mais, cerca de 8 vezes ou mais, cerca de 9 vezes ou mais, cerca de 10 vezes ou mais, cerca de 15 vezes ou mais, cerca de 50 vezes ou mais, ou cerca de 100 vezes ou mais.

Em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, da invenção com uma ou mais funções efetoras reduzidas, como aqui descrito, não se liga a um receptor efetor específico ou subtipo de receptor efetor. Em algumas dessas modalidades, a proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, não

se liga a Fc γ RIIa.

Em certas modalidades, a função efetora reduzida exibida por qualquer um dos anticorpos aqui descritos é ligação reduzida a uma proteína do complemento. Em algumas modalidades, a proteína do complemento é C1q. Em certas modalidades, a ligação reduzida a uma proteína do complemento é por um fator de cerca de 1,5 vez ou mais, cerca de 2 vezes ou mais, cerca de 3 vezes ou mais, cerca de 4 vezes ou mais, cerca de 5 vezes ou mais, cerca de 6 vezes ou mais, cerca de 7 vezes ou mais, cerca de 8 vezes ou mais, cerca de 9 vezes ou mais, cerca de 10 vezes ou mais, ou cerca de 15 vezes ou mais.

Em modalidades adicionais da presente invenção, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, da invenção compreende uma ou mais modificações ou variações na região Fc, não é glicosilado e desperta uma ou mais funções efetoras reduzidas quando administrado a um indivíduo.

Em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, da invenção causa menos efeitos tromboembólicos do que a administração de anticorpo anti-CD154 5c8 quando administrado a um indivíduo.

Em certas modalidades da presente invenção, o primeiro resíduo de aminoácido modificado das proteínas de ligação de CD154 ou dos anticorpos anti-CD154 que compreendem regiões Fc variantes descritas acima está ligado a uma porção funcional. Em modalidades adicionais, a porção funcional é uma porção de bloqueio, uma porção detectável, uma porção diagnóstica ou uma porção terapêutica, ou uma combinação das mesmas. Uma porção de bloqueio, em certas modalidades, pode ser, por exemplo, um aduto de cisteína, dissulfeto misto, polietileno glicol ou polietileno glicol maleimida. Uma porção detectável, em certas modalidades, pode ser, por exemplo, uma porção fluorescente, uma porção luminescente ou uma porção isotópica. Em modalidades nas quais uma porção diagnóstica é usada, a porção diagnóstica pode ser capaz de revelar a presença de uma condição, uma doença ou um distúrbio. Em outras modalidades, uma porção terapêuti-

ca como, por exemplo, um agente anti-inflamatório, um agente anticâncer, um agente antineurodegenerativo, um anticorpo que é seletivo para uma molécula diferente de CD154 ou um agente anti-infeccioso, pode ser usado.

5 Em certas modalidades da presente invenção, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, compreende um resíduo de aminoácido modificado, a modificação permitindo a conjugação sítio-dirigida da proteína ou do anticorpo a uma porção funcional, por exemplo, peguilação sítio-dirigida. Em certas modalidades, o resíduo de aminoácido modificado é um resíduo de cisteína modificado por um aduto de cisteína ou dissulfeto misto. Dessa forma, em certas modalidades, a proteína de
10 ligação de CD154 é um polipeptídeo do anticorpo anti-CD154 que é peguilado em um resíduo de aminoácido modificado, por exemplo, em um resíduo de cisteína ou lisina. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD154 é um fragmento Fab ou Fab' peguilado com PEG-maleimida.

15 Esta invenção também fornece um ácido nucleico, por exemplo, sequências de DNA que codificam as proteínas de ligação de CD154, por exemplo, os anticorpos anti-CD154, da invenção. As sequências de DNA da presente invenção podem compreender DNA sintético, por exemplo, produzido por processamento químico, cDNA, DNA genômico ou qualquer combinação dos mesmos. Esta invenção ainda fornece vetores de clonagem ou de
20 expressão que compreendem um ou mais ácidos nucleicos, por exemplo, sequências de DNA da presente invenção. A invenção também está relacionada, em algumas modalidades, a um vetor que compreende qualquer um dos ácidos nucleicos sintéticos, isolados e/ou recombinantes descritos acima.
25

Esta invenção também fornece uma célula hospedeira que compreende uma sequência de DNA ou um vetor da invenção. Em certos aspectos, a presente invenção está relacionada a um método para a produção de uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-
30 CD154, que compreende o cultivo de uma célula hospedeira que compreende qualquer um dos vetores descritos acima sob condições adequadas à produção da proteína de ligação de CD154 ou do anticorpo anti-CD154 pela

célula hospedeira. Em algumas modalidades, o método compreende a recuperação da proteína de ligação de CD154 ou do anticorpo anti-CD154 da cultura da célula hospedeira.

Em certas modalidades, a proteína de ligação de CD154, o anticorpo anti-CD154 ou o ácido nucleico desta invenção é marcado com um marcador detectável, que pode ser um isótopo radioativo, uma enzima, um corante ou biotina. Em certas outras modalidades, o anticorpo desta invenção está conjugado a pelo menos outro agente terapêutico, que pode ser um radioisótopo, radionuclídeo, toxina, toxoide, um polipeptídeo ou fragmento de anticorpo não-específico para CD154 (isto é, criando um anticorpo biespecífico ou multiespecífico), ou agente quimioterápico, por exemplo. Ainda em outras modalidades, o anticorpo desta invenção está conjugado a um agente de formação de imagem, que poderia ser uma porção marcadora. O agente marcador também pode ser biotina, uma porção fluorescente ou luminescente, uma porção radioativa, um *tag* de histidina ou um *tag* de peptídeo.

A presente invenção também está relacionada a variantes de sequência das proteínas de ligação de CD154, por exemplo, os anticorpos anti-CD154, aqui descritos, e sequências de ácidos nucleicos que os codificam. As variantes de sequência da invenção preferivelmente compartilham pelo menos 90%, 91%, 92%, 93% ou 94% de identidade com um polipeptídeo da invenção ou com uma sequência de ácidos nucleicos que o codifica. Mais preferivelmente, uma variante de sequência compartilha pelo menos 95%, 96%, 97% ou 98% de identidade no nível de aminoácido ou ácido nucleico. Mais preferivelmente ainda, uma variante de sequência compartilha pelo menos 99%, 99,5%, 99,9% ou mais de identidade com um polipeptídeo da invenção ou uma sequência de ácidos nucleicos que o codifica.

Consequentemente, a presente invenção fornece uma proteína isolada que compreende uma sequência que é pelo menos 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 ou 100% idêntica à sequência da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:

15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 ou SEQ ID NO: 72.

Em certas modalidades, um polipeptídeo quimérico, humanizado ou humano do anticorpo anti-CD154 da invenção é, por exemplo, um dAb, Fab, Fab', scFv, Fv, um Fv ligado por dissulfeto, ou compreende um domínio variável único de imunoglobulina, por exemplo, um domínio V_H ou V_L, que é específico e monovalente para a ligação de CD154. Certas proteínas de ligação de CD154, por exemplo, polipeptídeos quiméricos, humanizados ou humanos do anticorpo anti-CD154, da invenção compreendem uma, duas ou mais CDRs da invenção e sequências de estruturas alternativas ou estruturas universais. Em certas modalidades, as proteínas de ligação de CD154 e os anticorpos anti-CD154 da invenção compreendem um domínio variável único selecionado de uma cadeia pesada variável (V_H) e uma cadeia leve variável (V_L).

Esta invenção também fornece uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um polipeptídeo quimérico, humanizado ou humano do anticorpo anti-CD154, que é monovalente para a ligação ao CD154 que está conjugado a uma porção funcional que aumenta sua meia-vida *in vivo* em relação ao mesmo polipeptídeo desprovido da porção funcional. Em certas modalidades, a porção funcional compreende ou consiste em polietileno glicol. Em certas modalidades, a porção funcional compreende ou consiste em uma molécula de albumina, por exemplo, albumina sérica humana. Consequentemente, a invenção fornece a proteína de ligação de CD154 ligada ao PEG, por exemplo, um polipeptídeo quimérico humanizado ou humano do anticorpo anti-CD154 ligado ao PEG, que se liga especificamente e de forma monovalente ao CD154, e que possui uma meia-vida aumentada *in vivo* em relação ao mesmo polipeptídeo desprovido de polietileno glicol ligado.

Esta invenção também fornece uma composição farmacêutica

que compreende pelo menos uma proteína de ligação de CD154 da presente invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, que pode, em algumas modalidades, ainda compreender um veículo farmacologicamente aceitável. Uma composição farmacêutica da invenção pode opcionalmente ainda compreender um agente bioativo ou terapêutico adicional como, por exemplo, um composto ou agente imunossupressor ou imunomodulador; ou um agente diagnóstico. Em certas modalidades, a composição compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo Fab' anti-CD154 pegu-
5 lado que possui a especificidade de epitopo do anticorpo anti-CD154 342 ou
10 338, como aqui descrito.

A presente invenção ainda fornece um método para tratamento ou prevenção de uma condição, distúrbio, doença humana mediada, no todo ou em parte, por sinalização de CD40, ou um sintoma de qualquer um dos citados anteriormente, o método compreendendo a etapa de administração a
15 um indivíduo que dela necessita de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica que compreende uma proteína de ligação de CD154 da presente invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, de tal forma que seja obtida a terapia ou prevenção da condição, doença ou distúrbio.

Esta invenção também fornece um método para a inibição ou prevenção de um ou mais de uma resposta imune, autoimune ou inflamatória mediada, no todo ou em parte, por sinalização de CD40, ou um sintoma de qualquer um dos citados anteriormente, o método compreendendo a etapa de administração a um indivíduo que dela necessita de uma quantidade
25 terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica que compreende uma proteína de ligação de CD154 da presente invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, de tal forma que seja obtida uma resposta terapêutica ou preventiva. Em certas modalidades, o método é usado para tratar um indivíduo que apresenta sinais ou que recebeu o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (SLE). Em outras modalidades, o método é usado para tratar
30 um indivíduo que apresenta sinais ou que recebeu o diagnóstico de uma condição reumatoide como, por exemplo, artrite reumatoide (RA).

Esta invenção fornece um polipeptídeo de anticorpo humano que é monovalente para a ligação ao CD154. Em certas modalidades, o polipeptídeo de anticorpo humano que é monovalente para a ligação ao CD154, quando presente em concentrações de saturação ou acima delas para ligação de CD154 com base em sua afinidade de ligação, tanto bloqueia a ligação do anticorpo 5c8 ao CD154, quando adicionado ao CD154 primeiro, quanto desloca o anticorpo 5c8 ligado ao CD154 quando adicionado após o anticorpo 5c8 ter sido adicionado. Em certas modalidades, o polipeptídeo de anticorpo humano está ligado ao PEG. Em certas modalidades, o polipeptídeo de anticorpo humano não possui um domínio Fc. Em algumas das modalidades acima, a proteína de ligação de CD154 ou o polipeptídeo de anticorpo humano não desloca CD154 ligado ao CD40.

Em certas modalidades, a invenção fornece um anticorpo Fab' anti-CD154 peguilado que é monovalente para a ligação de CD154 e ainda fornece métodos para tratamento ou prevenção de um ou mais sintomas de artrite, por exemplo, artrite reumatoide, ou lúpus eritematoso sistêmico (S-LE), que compreende a etapa de administração a um indivíduo que dela necessita de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo Fab' anti-CD154 peguilado, de tal forma que seja obtida uma resposta terapêutica ou preventiva.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma tabela que apresenta as sequências de aminoácidos para as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dos anticorpos anti-CD154 342, 381 e 338.

A Figura 2 é uma tabela que apresenta as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes para os domínios V_H e V_L do anticorpo anti-CD154 de rato 342. As sequências sublinhadas correspondem à sequência de nucleotídeos que codifica um peptídeo líder (isto é, sinalizador).

A Figura 3 é uma tabela que apresenta as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes de estruturas receptoras humanas usadas para produzir os anticorpos humanizados anti-CD154 nos

Exemplos.

A Figura 4 é uma tabela que apresenta as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes dos domínios V_H e V_L em que as 342 CDRs foram enxertadas nas estruturas mostradas na Figura 3.

5 A Figura 5 é uma tabela que apresenta as sequências de aminoácidos e as sequências de nucleotídeos correspondentes de domínios V_H do anticorpo 342 (VH3 gH1 e VH4 gH1) em que as 342 CDRs foram enxertadas em estruturas receptoras humanas e em que certos resíduos doadores cruciais foram mantidos.

10 A Figura 6 é uma tabela que apresenta as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes de um domínio V_L do anticorpo 342 (VK1 gL4) em que as 342 CDRs foram enxertadas em estruturas receptoras humanas e em que certos resíduos doadores cruciais foram mantidos.

15 A Figura 7 é uma tabela que apresenta sequências para a cadeia leve completa (regiões variáveis e constantes da cadeia leve) e regiões da cadeia pesada do anticorpo 342. As sequências que correspondem aos peptídeos sinalizadores/líderes estão sublinhadas.

20 A Figura 8 mostra a sequência de nucleotídeos de insertos de expressão que foram usadas para a produção de versões Fab (SEQ ID NO: 28) e Fab' (SEQ ID NO: 41) de enxerto de gL4gH1 de 342. As sequências sinalizadoras/líderes estão sublinhadas e os sítios de restrição (usados para clonagem no vetor de expressão de *E. coli*, como descrito no Exemplo 2) estão em letras maiúsculas e mostrados em negrito.

25 A Figura 9 mostra um alinhamento de cadeias leves e pesadas da sequência de aminoácidos do anticorpo de rato 342 anti-CD154 (doadora) com as estruturas de linhagem germinativa humana (receptoras) usadas na humanização do anticorpo 342. "Leve 342" é a sequência do domínio V_L de rato. "Pesada 342" é a sequência do domínio V_H de rato. Os resíduos da CDR estão em negrito e sublinhados. As cadeias leves (2 1 1 O12; SEQ ID NO: 35) e pesadas (1-1 3-66; SEQ ID NO: 37 e 1-1 4-59; SEQ ID NO: 39) da estrutura receptora são mostradas. Enxertos somente de CDR em estruturas receptoras de linhagem germinativa humana também são mostrados (VK1

30

gL3, VH3 gH7 e VH4 gH6). Em certas cadeias pesadas e leves humanizadas, os resíduos doadores do anticorpo 342 são retidos dentro da região de estrutura, e esses resíduos doadores cruciais da estrutura são mostrados em negrito e itálico e estão realçados. O conteúdo doador de VK1 gL4 é R38, Y71 e S85. O conteúdo doador de VH3 gH1 é V24, M48, G49, T73 e V78. O conteúdo doador de VH4 gH1 é M48, R71 e V78. As SEQ ID NOS para as cadeias leves mostradas, na ordem de cima para baixo, são SEQ ID NO: 30 ("342"), SEQ ID NO: 35 ("2 1 1 O12"), SEQ ID NO: 14 ("342 gL3") e SEQ ID NO: 2 ("342 gL4"). As SEQ ID NOS para as cadeias pesadas mostradas (enxertos de VH3), na ordem de cima para baixo, são SEQ ID NO: 29 ("342"), SEQ ID NO: 37 ("1-1 3-66"), SEQ ID NO: 10 ("342 gH7") e SEQ ID NO: 1 ("342 gH1"). As SEQ ID NOS para as cadeias pesadas mostradas (enxertos de VH4), na ordem de cima para baixo, são SEQ ID NO: 29 ("342"), SEQ ID NO: 39 ("1-1 4-59"), uma variante da SEQ ID NO: 9 ("VH4 gH6" (SEQ ID NO: 74)) e uma variante da SEQ ID NO: 11 ("VH4 gH1" (SEQ ID NO: 75)). As variantes da SEQ ID NO: 9 e da SEQ ID NO: 11 mostradas na Figura 9 começam com o aminoácido "E" (em vez de "Q" como nas Figuras 4 e 5, respectivamente) para expressão em *E. coli*. Consequentemente, as sequências de nucleotídeos que correspondem a essas variantes das SEQ ID NOS: 9 e 11 diferem das sequências de nucleotídeos apresentadas na SEQ ID NO: 19 e na SEQ ID NO: 21 pelo fato de que começam com nucleotídeo "g" em vez de "c".

A Figura 10 fornece sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes de V_L e V_H para o anticorpo anti-CD154 381. As sequências de aminoácidos da CDR estão sublinhadas.

A Figura 11 fornece sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes de V_L e V_H para o anticorpo anti-CD154 338. As sequências de aminoácidos da CDR estão sublinhadas.

A Figura 12 é uma tabela que lista anticorpos de rato anti-CD154 humano isolados pelo "Método de Anticorpo de Linfócito Selecionado" (SLAM). A tabela fornece valores de K_d e IC_{50} obtidos com esses anticorpos em Biacore®, ensaios de ligação de CD40 e ensaios de suprarregu-

lação de ICAM-1. Os dados obtidos com anticorpo 342 estão realçados.

A Figura 13 fornece as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes da cadeia leve capa do anticorpo anti-CD154 hu5c8 não-glicosilado (hu5c8 aglyP-hulgG4).

5 A Figura 14 fornece as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes da cadeia pesada do anticorpo anti-CD154 hu5c8 não-glicosilado (hu5c8 aglyP-hulgG4). As mutações feitas para tornar a variante não-glicosilada (S228P/T299A na nomenclatura de Kabat EU; resíduos 226 e 297) são mostradas sublinhadas e em negrito na sequência da proteína madura.

10 A Figura 15 fornece as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes da cadeia leve capa do anticorpo anti-CD154 hu342 não-glicosilado (hu342 aglyP-hulgG4).

15 A Figura 16 fornece as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos correspondentes da cadeia pesada do anticorpo anti-CD154 hu342 não-glicosilado (hu342 aglyP-hulgG4). As mutações feitas para tornar a variante não-glicosilada (S228P/T299A na nomenclatura de Kabat EU; resíduos 226 e 297) são mostradas sublinhadas e em negrito na sequência da proteína madura.

20 A Figura 17 mostra fragmentos Fab' exemplares e um gel que mostra a PEGuilação sítio-específica de um fragmento Fab' de um anticorpo anti-CD154. O Fab' foi peguilado por reação de PEG-maleimida com um único resíduo de cisteína na dobradiça (*hinge*).

25 A Figura 18 é uma tabela que apresenta valores de K_d e IC_{50} obtidos em Biacore®, ensaios de ligação de CD40, ensaios de suprarregulação de ICAM-1 e ensaios de ligação de CD40L por competição para diferentes modalidades do anticorpo 342 gL4gH1 humanizado, incluindo fragmentos Fab' e conjugados anticorpo-PEG.

30 A Figura 19 mostra dois gráficos dos valores da titulação de IgG anti-TT (toxóide tetânico) em função do tempo em macacos cinomolgus que recebem um controle de solução salina ou várias doses de anticorpos anti-CD154. O gráfico superior mostra os valores da titulação de IgG para os dias

0-20 após tratamento com anticorpo e ataque de TT (a resposta imunológica primária), e o gráfico inferior mostra os valores para os dias 30-50 após tratamento com anticorpo e um segundo ataque de TT no 30º dia.

5 A Figura 20 é um gráfico dos valores da titulação de IgG anti-TT (toxóide tetânico) em função do tempo em macacos cinomolgus que recebem vários formatos de anticorpos anti-CD154 em uma dose única (20 mg/kg para hu5c8, 5c8 não-glicosilado e 342 não-glicosilado, e 40 mg/kg para 342 Fab'-PEG e 342 DFM-PEG). DFM-PEG é um fragmento de anticorpo no qual dois fragmentos Fab' são entrecruzados com uma ponte de dimaleimida PEGuilada.
10

A Figura 21 é um gráfico dos valores da titulação de IgM anti-TT (toxóide tetânico) em função do tempo em macacos cinomolgus que recebem um controle de solução salina ou várias doses de anticorpos anti-CD154. O gráfico mostra os valores da titulação de IgM para os dias 0-20 após ataque com TT (resposta primária).
15

A Figura 22 é um gráfico que compara a farmacocinética em macacos cinomolgus do anticorpo Fab de 342 '-PEG e do anticorpo hu5c8.

A Figura 23 mostra os resultados da análise por citometria de fluxo do bloqueio cruzado da ligação de 342 Fab' marcado às células Jurkat D1.1 que expressam CD154 pré-ligadas a um primeiro Fab' anti-CD154 não marcado, como indicado em cada painel (23A - A33; 23B - 338; 23C - 402; 23D - 381; 23E - 300; 23F - 294; 23G - 335; 23H - 303) (vide o Exemplo 9). A33 é um anticorpo de controle com isótipo compatível e confirma que não há bloqueio cruzado não específico.
20

A Figura 24 mostra os resultados da análise por citometria de fluxo do bloqueio cruzado da ligação de Fab' de Hu5c8 às células Jurkat D1.1 que expressam CD154 pré-ligadas a um primeiro Fab' anti-CD154 não marcado, como indicado em cada painel (24A - 338; 24B - 402; 24C - 381; 24D - 303; 24E - 335; 24F - 300; 24G - 294; 24H - A33) (vide o Exemplo 9). A33 é um anticorpo de controle com isótipo compatível e confirma que não há bloqueio cruzado não específico.
25
30

As Figuras 25 A-F mostram os resultados da análise Biacore®

da ligação competitiva de várias formas dos anticorpos 342 e Hu5c8 à proteína CD154 solúvel (ECD) ou a um complexo CD40: CD154. FL - comprimento completo. CD40hFc - proteína de fusão de CD40 humano.

5 A Figura 26 é um gráfico que mostra os resultados de um ensaio de agregação plaquetária descrito no Exemplo 11 (Ensaio 1) realizado com o anticorpo anti-CD154 Hu5c8, anticorpo anti-CD154 Fab de 342'-PEG e anticorpos de controle. Esse primeiro painel mostra os resultados obtidos com complexos de CD40L formados com IgG inteira e o segundo painel mostra complexos formados com Fab'-PEG ou diFab'-PEG. O terceiro painel mostra
10 os resultados obtidos com triFab'-PEG e anticorpo anti-CD154 hu342 não-glicosilado.

A Figura 27 é um gráfico que mostra os resultados de um ensaio de agregação plaquetária descrito no Exemplo 11 (Ensaio 2) realizado com anticorpos de controle positivos e negativos. Os resultados demonstram que
15 a agregação plaquetária é especificamente aumentada por complexos do anticorpo anti-CD154 de controle positivo e CD40L solúvel recombinante humano (sCD154).

A Figura 28 mostra um alinhamento de sequências de sequências de aminoácidos de CD40L solúvel humano (SEQ ID NO: 76) e de camundongo (SEQ ID NO: 77). As diferenças entre as sequências humanas e de camundongo estão indicadas em vermelho. As sequências do epítipo de Hu5c8 estão indicadas em azul. Os resíduos internos estão marcados com "|". Foram selecionadas seis regiões (1-6) da sequência onde foram introduzidos resíduos humanos em CD40L solúvel de camundongo.
20

A Figura 29 mostra os resultados de um ensaio de competição ELISA para demonstrar o bloqueio cruzado de Fab' de 342 e Fab' de hu5c8 (vide o Exemplo 14). A Figura 29A mostra os resultados de uma titulação de biotina Fab' de 342 em CD154. Uma concentração de 1 nM está na parte linear da curva. A Figura 29B mostra os resultados de uma titulação de biotina Fab' de hu5c8 em CD154. Uma concentração de 0,3 nM está na parte linear da curva. A Figura 29C mostra o bloqueio cruzado de biotina 342 e biotina 5c8 por Fab' de 342 não marcado. ch342 Fab é o Fab' de 342 quimé-
30

rico. A Figura 29D mostra o bloqueio cruzado de biotina 342 por Fab' de 5c8 não marcado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 A fim de que a invenção aqui descrita possa ser mais plenamente compreendida, será apresentada a seguir sua descrição detalhada. A menos que definido de forma diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui usados possuem os mesmos significados comumente entendidos por aqueles versados na técnica à qual esta invenção pertence. Métodos e materiais e-
xemplares são descritos abaixo, embora métodos e materiais similares ou
10 equivalentes àqueles aqui descritos também possam ser usados na prática da presente invenção e ficarão evidentes para aqueles versados na técnica.

Ao longo de todo este pedido, várias patentes, publicações e referências são citadas. As descrições dessas patentes, publicações e referências são aqui incorporadas por referência neste pedido em suas totalidades.

15 Trabalhos de referência padronizados apresentados nos princípios gerais de tecnologia de DNA recombinante conhecidos por aqueles versados na técnica incluem Ausubel e outros, "Current Protocols In Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York (1998 e Suplementos até 2001); Sambrook e outros, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Edição,
20 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova York (1989); Kaufman e outros, Eds., "Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine", CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson, Ed., "Directed Mutagenesis: A Practical Approach", IRL Press, Oxford (1991).

25 Trabalhos de referência padronizados apresentados nos princípios gerais de imunologia conhecidos por aqueles versados na técnica incluem: Harlow e Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", 2ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1999); e Roitt e outros, "Immunology", 3ª Edição, Mosby-Year Book Europe Limited, Londres (1993). Trabalhos de referência padronizados apresentados nos princípios
30 gerais de fisiologia e farmacologia médica conhecidos por aqueles versados na técnica incluem: Fauci e outros, Eds., "Harrison 's Principles Of Internal Medicine", 14ª Edição, McGraw-Hill Companies, Inc. (1998).

Definições

Como aqui usado, o termo "proteína de ligação de CD154" inclui qualquer molécula, incluindo um anticorpo, que se ligue especificamente ou antagonize CD154. Dessa forma, como aqui usado, um anticorpo anti-
5 CD154 é uma classe de proteínas de ligação específicas para CD154. Uma proteína de ligação de CD154 da invenção pode compreender pelo menos uma, de preferência duas, três ou mais CDRs, como aqui descrito. Uma proteína de ligação de CD154 ou outro antagonista de CD154 desse tipo pode englobar espécies que não sejam fragmentos ou derivados clássicos de anticorpos, mas que, no entanto, compreendam sequências de aminoácidos
10 e/ou estruturas químicas que conferem especificidade de ligação de epitopo de CD154. Esses antagonistas de CD154 podem ser feitos, por exemplo, a partir de estruturas alternativas (vide, por exemplo, Binz e outros 2005 *Nat. Biotech.* 23: 1.257-1.268 e Hosse e outros 2006 *Protein Science* 15: 14-27).
15 Uma proteína de ligação de CD154 ou antagonista desse tipo pode ser fundida a uma região Fc de anticorpo que seja funcionalmente deficiente ou a uma porção funcional heteróloga, como aqui descrito, para aumentar a meia-vida e/ou outras propriedades *in vivo* da proteína de ligação de CD154.

As proteínas de ligação de CD154 podem compreender pelo
20 menos uma das CDRs aqui descritas incorporada em uma estrutura biocompatível. Em um exemplo, a estrutura biocompatível compreende um polipeptídeo, ou porção do mesmo, que seja suficiente para formar um suporte ou uma estrutura conformacionalmente estável que seja capaz de exibir uma ou mais sequências de aminoácidos que se ligam a um antígeno (por exemplo,
25 CDRs, um domínio variável etc.) em uma região localizada da superfície. Essas estruturas podem ser um polipeptídeo de ocorrência natural ou "dobra" (um motivo estrutural) de polipeptídeo, ou pode ter uma ou mais modificações como, por exemplo, adições, eliminações ou substituições de aminoácidos, em relação a um polipeptídeo de ocorrência natural ou dobra. Essas
30 estruturas podem ser derivados de um polipeptídeo de qualquer espécie (ou de mais de uma espécie), por exemplo, de um ser humano, de outro mamífero, de outro vertebrado, de um invertebrado, de uma planta, de bactéria ou

vírus.

Tipicamente, as estruturas biocompatíveis se baseiam em estruturas ou esqueletos de proteína diferentes de domínios de imunoglobulina. Por exemplo, podem ser usados aqueles baseados em fibronectina, anquirina, lipocalina, neocarzinostatina, citocromo b, dedo de zinco CP1, PST1, 5 espiral enrolado, LACI-D1, domínio Z e domínios *tendraxisat* (vide, por exemplo, Nygren e Uhlen, 1997, "Current Opinion in Structural Biology", 7, 463-469).

O termo "anticorpo", como é aqui usado com relação à invenção, inclui um anticorpo isolado, recombinante ou sintético, conjugado de anticorpo ou derivado de anticorpo. O termo "anticorpo" frequentemente visa incluir um fragmento de anticorpo, incluindo um fragmento de ligação de antígeno, a menos que indicado ou subentendido pelo contexto de forma diferente. Um fragmento de ligação de antígeno compete com o anticorpo intacto pela ligação específica. Vide, de forma geral, "Fundamental Immunology", 15 Capítulo 7 (Paul, W., ed., 2ª Edição, Raven Press, N.Y. (1989)). Fragmentos de ligação de antígeno podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Em algumas modalidades, fragmentos de ligação de antígeno incluem Fab, F(ab)₂, 20 Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd, Fv, anticorpos de domínio (dAb), outros fragmentos monovalentes e divalentes, fragmentos da região determinante de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia única (por exemplo, scFv, scFab, e scFabAC), anticorpos quiméricos, *diacorpos*, *triacorpos*, *minicorpos*, *nano-**corpos* e polipeptídeos que contêm pelo menos uma porção de um anticorpo 25 que seja suficiente para conferir ligação antígeno-específica ao polipeptídeo; e fusões e derivados dos citados anteriormente. Vide, por exemplo, Holliger e Hudson, *Nature Biotechnology* 23: 1.126-1.136 (2005) e Hust e outros, *BMC Biotech.* 7: 14 (2007).

Um "fragmento Fd" é um fragmento de anticorpo que consiste nos domínios V_H e CH₁; um "fragmento Fv" consiste nos domínios V_L e V_H de um braço simples de um anticorpo; um "fragmento scFv" é um anticorpo de cadeia única que compreende uma região variável da cadeia pesada (V_H)

e uma região variável da cadeia leve (V_L) unidas por um vinculador peptídico; um "fragmento scFab" é um anticorpo de cadeia única que compreende um fragmento difícil (Fd) unido a uma cadeia leve por um vinculador peptídico; um fragmento "scFabAC" é uma variante de scFab, sem cisteína (vide, por exemplo, Hust e outros, *supra*); e um "fragmento dAb" (anticorpo de domínio único) compreende um domínio variável único (por exemplo, um domínio V_H ou um domínio V_L) (Ward e outros, *Nature* 341: 544-546 (1989)). Além disso, também são incluídos *diacorpos* e *triacorpos*. Os *diacorpos* e *triacorpos* da presente invenção incluem, por exemplo, *diacorpos* e *triacorpos* homodiméricos e heterodiméricos. Por exemplo, em certas modalidades, os domínios variáveis que constituem um *triacorpo* podem se ligar a três epitopos diferentes ou a epitopos idênticos.

A menos que estabelecido de forma diferente ou quando indicado pelo contexto, um "anticorpo" da presente invenção inclui anticorpos inteiros e quaisquer fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, derivados de anticorpos ou variantes que possam conter uma ou mais modificações (por exemplo, uma inserção, eliminação ou substituição de aminoácidos, uma modificação pós-tradução ou ausência desta etc.), incluindo conjugados de anticorpo (isto é, anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno desse conjugado ou associado a uma porção funcional). Os derivados de anticorpos, incluindo conjugados de anticorpo, podem ser baseados ou podem compreender um fragmento de ligação de antígeno da invenção que se liga especificamente ao CD154. Adicionalmente, as modalidades de anticorpo citadas anteriormente podem ser anticorpos murinos, de hamster, de cabra, de coelho, quiméricos, humanizados ou totalmente humanos, fragmentos, derivados ou conjugados. Entende-se que, em certos aspectos da invenção, o termo "anticorpo" pode excluir uma ou mais das modalidades de anticorpo citadas acima; essas condições serão evidentes para aqueles versados na técnica.

O termo "peguilação," "polietileno glicol" ou "PEG" inclui um composto de polialquilenol glicol, ou um derivado do mesmo, com ou sem agentes de acoplamento ou derivatização com porções de acoplamento ou

ativação (por exemplo, com tiol, triflato, tresilato, azirdina, oxirano ou, de preferência, com uma porção maleimida, por exemplo, PEG-maleimida). Outros compostos de polialquileno glicol adequados incluem, sem limitação, maleimido monometóxi PEG, PEG ativado de polipropileno glicol, mas também

5 polímeros com carga ou neutros dos seguintes tipos: dextrana, ácidos colomínicos, ou outros polímeros baseados em carboidratos, polímeros de aminoácidos e biotina e outros derivados de reagentes de afinidade.

O termo "função efetora" refere-se à habilidade funcional da região Fc ou constante de um anticorpo para se ligar a proteínas e/ou células do sistema imunológico. Anticorpos que possuem função efetora reduzida e métodos para a criação por engenharia genética desses anticorpos são bem-conhecidos na técnica (vide, por exemplo, WO 05/18572, WO 05/03175 e U.S. 6.242.195) e serão descritos com mais detalhes neste relatório descritivo. Funções efetoras típicas incluem a habilidade para se ligar à proteína do complemento (por exemplo, a proteína do complemento C1q) e/ou a um receptor Fc(FcR) (por exemplo, Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIIa, Fc γ RIII e/ou Fc γ RIIIb). As consequências funcionais de serem capazes de se ligar a uma ou mais das moléculas citadas anteriormente incluem, sem limitação, opsonização, fagocitose, citotoxicidade celular antígeno-dependente (ADCC),

10 citotoxicidade complemento-dependente (CDC) e/ou modulação da célula efetora. Uma diminuição na função efetora refere-se a uma diminuição em uma ou mais das atividades bioquímicas ou celulares induzidas, pelo menos em parte, pela ligação de Fc ao seu receptor cognato ou a uma proteína do complemento ou célula efetora, embora mantendo a atividade de ligação de

15 antígeno da região variável do anticorpo (ou fragmento do mesmo), embora com afinidade de ligação reduzida, similar, idêntica ou aumentada. Anticorpos da invenção específicos exibem função efetora reduzida. As diminuições da função efetora, por exemplo, ligação de Fc a um receptor Fc ou a uma proteína do complemento, podem ser expressas em termos de número de

20 vezes de redução (por exemplo, reduzida por 1,5 vez, 2 vezes, e similares), e podem ser calculadas com base, por exemplo, nas reduções percentuais na atividade de ligação determinadas usando ensaios de ligação conhecidos

25

30

na técnica (vide, por exemplo, WO 05/18572).

A menos que o contexto defina de forma diferente, os termos no singular devem incluir pluralidades e termos no plural devem incluir a forma no singular.

5 Ao longo de todo este relatório descritivo e nas reivindicações, a palavra "compreende," ou variações como "que compreende" ou "compreendendo", será subentendida como implicando na inclusão de um número inteiro ou grupo de números inteiros estabelecido, mas não na exclusão de qualquer outro número inteiro ou grupo de números inteiros.

10 CD154

 CD154 é conhecido na técnica por vários outros nomes, tais como ligante de CD40 (CD40L), contra receptor de CD40 (CD40CR), gp39, T-BAM, Molécula de Ativação de Célula T, TRAF, Proteína de Ativação Relacionada ao TNF (TRAP) e Membro 5 da Superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNFSF5) (Gauchat e outros, 1993 *FEBS Lett.* 315: 259-266; Graf e outros 1992, *Europ. Immun.* 22: 3.191-3.194; Hollenbaugh e outros, 1992 *EMBO J.* 11: 4.313-4.321). Esses termos são usados de forma intercambiável ao longo de todo o relatório descritivo. As proteínas de ligação de CD154 desta invenção, incluindo anticorpos, se ligam especificamente ao CD154 humano e podem apresentar reação cruzada e, portanto, se ligam especificamente ao CD154 de outras espécies. Em certas modalidades, as proteínas de ligação de CD154 desta invenção, incluindo anticorpos, se ligam especificamente ao CD154 humano, CD154 de camundongo ou CD154 de primata não-humano.

25 Anticorpos anti-CD154 e proteínas de ligação de CD154

 O termo "anticorpo anti-CD154", como aqui usado, refere-se a uma molécula de imunoglobulina que é capaz de se ligar especificamente a um epitopo em um antígeno de CD154. Os anticorpos anti-CD154 podem ser imunoglobulinas intactas derivadas de fontes naturais ou de fontes recombinantes, e podem ser porções imunorreativas de imunoglobulinas intactas. Os anticorpos são tipicamente tetrâmeros de moléculas de imunoglobulina.

Consequentemente, como citado em todas as modalidades e métodos desta invenção, um "anticorpo anti-CD154" engloba (a menos quando indicado de forma diferente ou quando sugerido de forma diferente pelo contexto) um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo de murino, um anticorpo de hamster, um anticorpo de cabra, um anticorpo de coelho, um anticorpo quimérico, um anticorpo sensibilizado, um anticorpo humanizado, um anticorpo (totalmente) humano, um anticorpo multimérico, um anticorpo heterodimérico, um anticorpo hemidimérico, um anticorpo bi-, tri- ou tetravalente, um anticorpo biespecífico, um anticorpo de cadeia única (por exemplo, scFv, scFab e scFabAC), Bis-scFv, um *diacorpo*, *triacorpo* ou *tetracorpo*, anticorpos de domínio único e fragmentos Fab modificados. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD154 é um anticorpo que compreende apenas um domínio variável único de imunoglobulina. Consequentemente, anticorpos monovalentes incluem anticorpos que compreendem apenas um domínio variável de imunoglobulina (isto é, uma única cadeia variável leve ou pesada) e que se ligam especificamente ao CD154. Além disso, os anticorpos anti-CD154 da invenção podem ser monovalentes, divalentes ou multivalentes para CD154.

Em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, com função efetora reduzida compreende qualquer porção de um anticorpo anti-CD154 que seja suficiente para manter ligação específica ao antígeno de CD154. Por exemplo, o anticorpo pode compreender apenas um único domínio variável de imunoglobulina um domínio V_H ou V_L .

Consequentemente, em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, é um fragmento de anticorpo. Fragmentos de anticorpo incluem, por exemplo, um fragmento Fab, um fragmento $F(ab)_2$, um fragmento Fab', um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento $F(ab')_3$, um fragmento F(v) de cadeia única ou um fragmento F(v) e fragmentos de ligação de epitopo de qualquer um dos citados acima (vide, por exemplo, Holliger e Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23 (9): 1.126-1.136). Os fragmentos de anticorpo da invenção serão descritos com mais detalhe

abaixo.

Em um exemplo, as proteínas de ligação de CD154 ou anticorpos anti-CD154 são anticorpos (por exemplo, anticorpos do subtipo IgG4) ou fragmentos (por exemplo, fragmentos Fab') que possuem uma região de dobradiça (*hinge*) nativa ou uma modificada. Foram descritas várias regiões de dobradiça modificadas, por exemplo, na Patente U.S. 5.677.425, WO 99/15549 e WO 98/25971. Em outro exemplo, os anticorpos da invenção são modificados em suas regiões constantes, como aqueles anticorpos descritos em WO 05/003169, WO 05/003170 e WO 05/003171. Qualquer um dos anticorpos anti-CD154, derivados de anticorpos ou fragmentos de anticorpos mencionados anteriormente pode ser usado para formar os conjugados de anticorpo da presente invenção. Qualquer um dos anticorpos, fragmentos e conjugados acima pode despertar uma função efetora reduzida, comparados com um segundo anticorpo anti-CD154.

As moléculas de anticorpo da invenção podem ser de qualquer classe (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD ou IgA) ou subclasse de molécula de imunoglobulina. Os domínios da região constante do anticorpo, se presentes, podem ser selecionados considerando-se a função proposta da molécula de anticorpo. Por exemplo, os domínios da região constante podem ser domínios de IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM humana. Em particular, podem ser usados domínios da região constante de IgG humana, especialmente IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Os isótipos IgG2 e IgG4 podem ser usados em certas modalidades nas quais a molécula de anticorpo se destina aos usos terapêuticos para os quais são desejadas funções efetoras de anticorpo reduzidas ou eliminadas. Alternativamente, os isótipos IgG1 e IgG3 podem ser usados quando a molécula de anticorpo se destina a fins terapêuticos para os quais são necessárias funções efetoras de anticorpo.

Em algumas modalidades, uma ou mais das CDRs de uma proteína de ligação de CD154 da invenção, por exemplo, anticorpo, podem ser incorporadas em um ou mais domínios de imunoglobulina, estruturas universais, estruturas de proteína ou outras estruturas biocompatíveis com base em estruturas ou esqueletos de proteína diferentes de domínios de imuno-

globulina (Nygren & Uhlén, 1997, *Curr. Opin. Strural Biol.* 7: 463-469; Saragovi e outros, 1992, *Bio/Technology* 10: 773-779; Skerra, 2000, *J. Mol. Recognition* 13: 167-187). Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo anti-CD154 são incorporadas em uma estrutura universal (isto é, uma estrutura que pode ser usada para criar uma variabilidade total de funções, especificidades ou propriedades que são originalmente sustentadas por uma grande coleção de diferentes estruturas, vide a U.S. 6.300.064). Em outras modalidades, podem ser usados estruturas alternativas (vide, por exemplo, Binz e outros 2005 *Nat. Biotech.* 23: 1.257-1.268 e Hosse e outros 2006 *Protein Science* 15: 14- 27) para criar proteínas de ligação de CD154 da invenção.

O termo "anticorpo anti-CD154" também engloba um anticorpo sintético ou um anticorpo recombinante que é gerado com o uso de tecnologia de DNA recombinante como, por exemplo, um anticorpo expresso por um bacteriófago. O termo "anticorpo anti-CD154" também deve ser considerado como incluindo um anticorpo que foi gerado pela síntese de uma molécula de DNA que codifica o anticorpo e cuja molécula de DNA expressa uma proteína de anticorpo ou uma sequência de aminoácidos que especifica o anticorpo, em que o DNA ou a sequência de aminoácidos foi obtido com o uso de tecnologia de DNA sintético ou de sequência de aminoácidos que está disponível e é bem-conhecido na técnica.

Em uma modalidade, a invenção fornece um "anticorpo anti-CD154" que é um anticorpo monoclonal. Um anticorpo monoclonal refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto quanto às possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em pequenas quantidades. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como necessitando que a produção do anticorpo seja feita por qualquer método em particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo

método de hibridoma (murino ou humano) descrito pela primeira vez por Kohler e outros, *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser feitos por métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, U.S. 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpo em fago com o uso das técnicas descritas em Clackson e outros, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks e outros, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por exemplo. Entende-se também que certas modalidades da presente invenção são relacionadas às composições que compreendem um ou mais anticorpos monoclonais diferentes que se ligam especificamente ao CD154, isto é, uma composição de anticorpo policlonal que compreende diversos anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de epitopo.

Em outra modalidade da invenção, um "anticorpo anti-CD154" refere-se a um anticorpo que é um anticorpo quimérico, ou um derivado de anticorpo ou conjugado ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo. Tipicamente, anticorpos quiméricos incluem as regiões variáveis da cadeia pesada e/ou leve, incluindo tanto CDR quanto resíduos da estrutura, de uma espécie (tipicamente camundongo) fundidas às regiões constantes de outra espécie (tipicamente humanas). Esses anticorpos quiméricos de camundongo/humanos contêm aproximadamente 75% de sequências de aminoácidos humanas e 25% de camundongo. As sequências humanas representam as regiões constantes do anticorpo, enquanto as sequências de camundongo representam as regiões variáveis (e, dessa forma, contêm os sítios de ligação de antígeno) do anticorpo.

Em outra modalidade, as proteínas de ligação de CD154, os anticorpos anti-CD154 desta invenção incluem anticorpos, derivados de anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno que compreendem um domínio variável que compreende regiões de estrutura de um anticorpo e regiões de CDR de outro anticorpo.

Em uma modalidade mais específica, as proteínas de ligação de CD154 e os anticorpos anti-CD154 desta invenção incluem anticorpos quiméricos que compreendem regiões de estrutura e regiões de CDR de diferentes anticorpos humanos.

Métodos de produção de todos os anticorpos quiméricos descritos acima são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, U.S. 5.807.715; Morrison e outros (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (21): 6.851-5; Sharon e outros (1984) *Nature* 309 (5.966): 364-7; Takeda e outros (1985) *Nature* 314 (6.010): 452-4.

Em certas modalidades da presente invenção, um anticorpo anti-CD154 que se liga ao CD154 é gerado pelo "Método de Anticorpo de Linfócito Seleccionado" (SLAM) (Babcock e outros, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 7.843-7.848; WO 92/02551; de Wildt e outros, 1997, *J. Immunol. Methods*, 207: 61-67 e em Lagerkvist, e outros, 1995, *BioTechniques* 18: 862-869), que permite o isolamento de qualquer espécie de células que produzam anticorpos de alta afinidade durante respostas imunológicas *in vivo*. Outras técnicas incluem aquelas descritas por de Wildt e outros, 1997, *J. Immunol. Methods*, 207: 61-67 e Lagerkvist e outros, 1995, *BioTechniques* 18 (5): 862-869. O métodos acima se baseiam no isolamento de células produtoras de anticorpo individuais, que são então expandidas de forma clonal, seguido por rastreamento daqueles clones que produzem anticorpos anti-CD154, seguido pela identificação subsequente da sequência de seus genes da cadeia variável pesada (V_H) e leve (V_L). Um método de rastreamento em particular é detalhado em WO 04/051268. Dessa forma, são isoladas células B que são positivas para os anticorpos para CD154. As células B podem ser humanas, de camundongo, de rato, de hamster, de coelho, de cabra, ou outras espécies mamíferas. Os genes do anticorpo nessas células B podem ser clonados e expressos em uma célula hospedeira, por exemplo, por tecnologia convencional de DNA recombinante. Em certas modalidades, a célula hospedeira é *E. coli*. Outras células hospedeiras serão detalhadas abaixo. Os anticorpos (que incluem fragmentos de anticorpos como, por exemplo, fragmentos Fab') expressos nessas células podem ser purificados por meios convencionais. Se os anticorpos são de uma fonte não-humana, eles podem ser humanizados por métodos convencionais como, por exemplo, por mutagênese de seus genes. Os anticorpos humanizados podem ser subsequentemente expressos em uma célula hospedeira e podem ser purificados.

Anticorpos monoclonais podem ser preparados por qualquer método conhecido na técnica como, por exemplo, a técnica do hibridoma (Kohler & Milstein, *Nature*, 1975, 256: 495-497), a técnica do trioma, a técnica do hibridoma de célula B humana (Kozbor e outros, *Immunology Today*, 5 1983, 4, 72) e a técnica do EBV-hibridoma (Cole e outros, "Monoclonal antibodies and Cancer Therapy", páginas 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985). Os métodos para a criação e fabricação de anticorpos recombinantes são bem-conhecidos na técnica (vide, por exemplo, U.S. 4.816.397. U.S. 6.331.415; Simmons e outros, 2002, *Journal of Immunological Methods*, 263, 133-147; 10 WO 92/02551; Orlandi e outros, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 3.833; Riechmann e outros, 1988, *Nature*, 322, 323; U.S. 5.585.089; WO 91/09967; Mountain e Adair, 1992, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10, 1-142; Verma e outros, 1998, *J. Immunol. Methods*, 216: 165-181; Holliger e Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23 (9): 1.126-1.136).

15 Os anticorpos da presente invenção também podem ser gerados com o uso de vários métodos de exibição em fago conhecidos na técnica e incluem aqueles descritos por Brinkman e outros, 1995, *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50; Ames e outros, 1995, *J. Immunol. Methods*, 184, 177-186; Kettleborough e outros 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24, 952-958; Persic e 20 outros, 1997, *Gene*, 187, 9-18; e Burton e outros, 1994, *Advances in Immunol.*, 57, 191-280; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; e WO 95/20401; e US 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 e 25 5.969.108.

Além disso, camundongos transgênicos (por exemplo, criados por engenharia geneticamente), ou outros organismos, incluindo outros mamíferos, podem ser usados para produzir as proteínas de ligação e os anticorpos desta invenção (vide, por exemplo, U.S. 6.300.129). Por exemplo, 30 sabe-se que camundongos criados geneticamente para substituir apenas as regiões variáveis de *loci* imunes de camundongo (cadeia pesada V, D e segmentos J, e cadeia leve V e segmentos J) com as sequências variáveis

humanas correspondentes podem ser usados para produzir grandes quantidades de anticorpos de alta afinidade com sequências variáveis humanas (vide, por exemplo, U.S. 6.586.251, U.S. 6.596.541 e U.S. 7.105.348).

Em outra modalidade desta invenção, um "anticorpo anti-
5 CD154" refere-se a um anticorpo, derivado ou conjugado de anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, que é sensibilizado ou humanizado. Anticorpos sensibilizados e humanizados tipicamente incluem CDRs da cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo murino enxertado em um primata não-
humano ou região de estrutura V de anticorpo humano, normalmente com-
10 prendendo ainda uma região constante humana. Vide, por exemplo, Riechmann e outros (1988) *Nature* 332: 323-327; U.S. 6.054.297, 5.821.337, 5.770.196, 5.766.886, 5.821.123, 5.869.619, 6.180.377, 6.013.256, 5.693.761 e 6.180.370.

A base teórica para a utilização desses anticorpos sensibiliza-
15 dos ou humanizados é a retenção da especificidade de antígeno (humano) do anticorpo de camundongo conferida pelas CDRs de camundongo, mas com uma redução da imunogenicidade do anticorpo de camundongo (um anticorpo de camundongo causaria uma resposta imunológica contra ele em espécies diferentes, que não de camundongo) pela utilização da maior quan-
20 tidade de sequência de estrutura humana possível. Esses anticorpos podem ser usados em terapias humanas para minimizar ou eliminar os efeitos colaterais indesejados, tais como respostas imunológicas. Foram descritos anti-
corpos que compreendem CDRs doadoras enxertadas de anticorpos não-
humanos antígeno-específicas em estruturas receptoras homólogas de pri-
25 matas não-humano que possuem imunogenicidade reduzida em seres humanos (U.S. 2005/0208625; U.S. 2002/0062009; U.S. 7.338.658).

Consequentemente, formas humanizadas de anticorpos não-
humanos (por exemplo, murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias
de imunoglobulina ou fragmentos das mesmas (tais como Fv, Fab, Fab',
30 F(ab')₂ ou outras subsequências de ligação de antígeno de anticorpos) específicas que contêm sequências derivadas de sequências de imunoglobulina não-humana e de imunoglobulina humana. Em sua maior parte, anticor-

pos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo receptor são substituídos por resíduos das CDRs de uma espécie não-humana (anticorpo doador) como, por exemplo, camundongo, rato ou coelho, que possuem a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos da região de estrutura (FR) Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos da FR não-humana correspondentes.

Além disso, o anticorpo humanizado pode compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem nas sequências de CDR ou FR importadas. Essas modificações são feitas para refinar e otimizar ainda mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado pode compreender substancialmente tudo de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas, ou substancialmente todas, as regiões de CDR correspondem àquelas de uma imunoglobulina não-humana, e todos, ou substancialmente todos, os resíduos da FR são aqueles de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também pode compreender pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) de imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana.

Um anticorpo humanizado (que inclui, por exemplo, fragmentos de anticorpos e derivados ou conjugados de anticorpos) pode ser produzido por tecnologia de DNA recombinante, na qual alguns ou todos os aminoácidos de uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina humana que não são necessários para a ligação de antígeno (por exemplo, as regiões constantes e as regiões de estrutura dos domínios variáveis) são usados para substituir aminoácidos correspondentes da cadeia leve ou pesada do anticorpo não-humano cognato. Métodos para a produção de anticorpos humanizados são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica de anticorpos. Vide, por exemplo, EP 239400; Jones e outros (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann e outros (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen e outros (1988) *Science* 239: 1.534-1.536; Queen e outros (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10.029; Orlandi e outros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 3.833;

U.S. 6.180.370, e EP 519596, que descreve folheamento de anticorpo de resíduos de superfície.

Consequentemente, em uma modalidade desta invenção, um anticorpo anti-CD154 refere-se a um anticorpo humanizado (que inclui, sem
5 limitação, um fragmento humanizado de ligação de antígeno e um derivado ou um conjugado de anticorpo humanizado), que é gerado pelo transplante de CDRs murinos ou de rato (ou outras não-humanas) em um anticorpo humano. Mais especificamente, essa humanização é obtida da seguinte forma: (1) os cDNAs que codificam domínios variáveis da cadeia pesada e leve são
10 isolados de um hibridoma ou de uma célula B que secreta o anticorpo; (2) as sequências de DNA dos domínios variáveis, incluindo as CDRs, são determinadas por sequenciamento; (3) os DNAs que codificam as CDRs são transferidos para as regiões correspondentes de uma sequência codificadora do domínio variável da cadeia pesada ou leve de um anticorpo humano por
15 mutagênese sítio-dirigida; e (4) os segmentos do gene da região constante humana de um isótipo desejado (por exemplo, 1 para CH e k para CL) são adicionados. Finalmente, os genes da cadeia pesada e leve humanizada são coexpressos em células hospedeiras de mamíferos (por exemplo, células CHO ou NSO) para produzir um anticorpo humanizado solúvel.

20 Algumas vezes, a transferência direta de CDRs para uma estrutura humana leva à perda de afinidade de ligação de antígeno da proteína de ligação ou anticorpo resultante. A perda de afinidade de ligação de antígeno pode ocorrer porque, em alguns anticorpos cognatos, certos aminoácidos dentro das regiões de estrutura interagem com as CDRs e, dessa forma,
25 influenciam a afinidade de ligação de antígeno global do anticorpo. Nesses casos, aqueles versados na técnica observarão que seria crucial a introdução de "mutações retrógradas" nas regiões de estrutura do anticorpo receptor a fim de reter a atividade de ligação de antígeno do anticorpo cognato. As abordagens gerais para a produção de mutações retrógradas são bem-
30 conhecidas por aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Queen e outros (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10.029; Co e outros 1991. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 2.869-2.873; WO 90/07861; Tempest 1991.

Biotechnology 9: 266-271. Mutações retrógradas exemplares para os anticorpos da presente invenção incluem aqueles resíduos descritos na Figura 9 sob conteúdo do doador.

5 Em certas modalidades, a proteína de ligação ou o anticorpo da presente invenção pode compreender um domínio V_H que não é um domínio variável de imunoglobulina de camélideo ou murino. Em certas modalidades, o polipeptídeo de anticorpo pode compreender um domínio V_H que não contém um ou mais aminoácidos que são específicos para domínios variáveis de imunoglobulina de camélideos, quando comparados com domínios V_H
10 humanos.

Em uma modalidade desta invenção, um "anticorpo anti-CD154" refere-se a um anticorpo (que inclui um fragmento de ligação de antígeno e um derivado ou conjugado de anticorpo) que é totalmente humano. Um anticorpo totalmente "humano" compreende um polipeptídeo de anticorpo ou um
15 domínio variável de imunoglobulina que possui uma sequência derivada de uma imunoglobulina humana (por exemplo, obtida de uma sequência codificadora de imunoglobulina humana). O termo "anticorpo humano" inclui, por exemplo, anticorpos que possuem regiões variáveis e constantes (se presentes) derivadas de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. O termo "humano", como aqui aplicado a um anticorpo ou a um
20 fragmento como, por exemplo, um domínio variável, não engloba um anticorpo de outra espécie, por exemplo, de camundongo, que foi "humanizado" por meio de enxerto de sequências da região constante humana em um polipeptídeo de anticorpo (isto é, substituição de regiões constantes não-
25 humanas com regiões constantes humanas) ou por meio de enxerto de sequências da região de estrutura V humana em um domínio variável de imunoglobulina de um mamífero não-humano (isto é, a substituição de regiões de estrutura não-humanas de um domínio V com regiões de estrutura humanas). Foram descritos métodos de humanização de regiões variáveis de i-
30 munoglobulina por meio da modificação racional de resíduos determinantes de complementaridade (U.S. 2006/0258852).

Os anticorpos humanos podem, em certas modalidades, incluir

resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio-específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). Em certas modalidades, portanto, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende um domínio variável que possui uma ou mais regiões de estrutura (por exemplo, FW1, FW2, FW3 e/ou FW4) que compreendem uma sequência de aminoácidos que é a mesma que a sequência de aminoácidos de uma região de estrutura correspondente codificada por um segmento do gene de anticorpo de linhagem germinativa humana, ou que as sequências de aminoácidos de uma ou mais das referidas regiões de estrutura que compreendem coletivamente até 5 diferenças de aminoácidos em relação às sequências de aminoácidos da referida região de estrutura correspondente codificada por um segmento do gene de anticorpo de linhagem germinativa humana. Em modalidades adicionais, as sequências de aminoácidos das regiões de estrutura (FW1, FW2, FW3 e FW4) de um domínio variável são as mesmas que as sequências de aminoácidos de regiões de estrutura correspondentes codificadas por um segmento do gene de anticorpo de linhagem germinativa humana, ou as sequências de FW1, FW2, FW3 e FW4 contêm coletivamente até 10 diferenças de aminoácidos em relação às sequências das regiões de estrutura correspondentes codificadas pelo segmento do gene de anticorpo de linhagem germinativa humana. Segmentos do gene de anticorpo de linhagem germinativa exemplares incluem, por exemplo, DP47, DP45, DP48 e DPK9 (U.S. 2006/0062784), e segmentos que codificam sequências estrutura receptoras descritas nos Exemplos e nas Figuras.

Em algumas modalidades, um anticorpo humano (que inclui um fragmento de anticorpo ou uma sequência do domínio variável) possui pelo menos 85% de identidade de sequências de aminoácidos (incluindo, por exemplo, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% ou mais de identidade de sequências) para um anticorpo humano de ocorrência natural.

Os anticorpos totalmente humanos ou humanos podem ser derivados de camundongos transgênicos (por exemplo, produzidos genética-

mente, por exemplo, *knock-in*) que carregam genes de anticorpo humano (que carregam os éxons variáveis (V), de diversidade (D), de união (J) e constantes (C)) ou regiões V, D e J humanas de células humanas. Por exemplo, é agora possível produzir animais produzidos geneticamente (por exemplo, camundongos) que são capazes, mediante imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção endógena de imunoglobulinas (vide, por exemplo, Jakobovits e outros, *PNAS*, 90: 2.551 (1993); Jakobovits e outros, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann e outros, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); e Duchosal e outros, *Nature* 355: 258 (1992). Uma cepa de camundongo transgênico (por exemplo, produzido geneticamente, incluindo *knock-out*, *knock-in*, substituição de genes, e similares) pode ser produzida por engenharia genética para conter sequências gênicas de genes de imunoglobulina humana não rearranjados. As sequências humanas podem codificar tanto as cadeias pesadas quanto as leves de anticorpos humanos, e funcionariam corretamente nos camundongos, passando por rearranjo para fornecer um amplo repertório de anticorpos similar àquele em seres humanos. Os camundongos produzidos geneticamente podem ser imunizados com a proteína-alvo (por exemplo, CD154, fragmentos do mesmo, ou células que expressam CD154) para criar um arranjo variado de anticorpos específicos e seu RNA codificador. Os ácidos nucleicos que codificam os componentes da cadeia de anticorpo desses anticorpos podem então ser clonados pelo animal em um vetor de exibição. Tipicamente, populações separadas de ácidos nucleicos que codificam sequências da cadeia pesada e leve são clonadas, e as populações separadas são então recombinadas mediante inserção no vetor, de tal modo que certa cópia do vetor receba uma combinação aleatória de uma cadeia pesada e uma cadeia leve. O vetor é projetado para expressar cadeias de anticorpo de modo que elas possam ser montadas e apresentadas na superfície externa de um pacote de exibição que contém o vetor. Por exemplo, cadeias de anticorpo podem ser expressas como proteínas de fusão com uma proteína de revestimento de fago da superfície externa do fago. A seguir, os pacotes de exibição podem ser pesquisados quanto à exibição de ligação de anticorpos

a um alvo.

Além disso, anticorpos humanos podem ser derivados de bibliotecas de exibição em fago (Hoogenboom e outros, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks e outros, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Vaughan e outros
5 *Nature Biotech.* 14: 309 (1996), U.S. 6.300.064). Podem ser criadas bibliotecas de fago sintéticas que usam combinações randomizadas de regiões V sintéticas de anticorpo humano. Por seleção no antígeno, podem ser feitos anticorpos totalmente humanos nos quais as regiões V têm natureza muito similar à humana. Vide U.S. 6.794.132, 6.680.209, 4.634.666, e Ostberg e
10 outros (1983), *Hybridoma* 2: 361-367.

Para a geração de anticorpos humanos, vide também Mendez e outros *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997), Green e Jakobovits *J. Exp. Med.* 188: 483-495 (1998). Anticorpos humanos são ainda discutidos e delineados nas Patentes U.S. 5.939.598 e 6.673.986. Vide também as Patentes U.S.
15 6.114.598, 6.075.181 e 6.162.963. Vide também as Patentes U.S. 6.150.584, U.S. 6.713.610, U.S. 6.657.103, U.S. 2003/0229905 A1, U.S. 2004/0010810 A1, U.S. 2004/0093622 A1, U.S. 2006/0040363 A1, U.S. 2005/0054055 A1, U.S. 2005/0076395 A1 e U.S. 2005/0287630 A1. Vide também EP 0463151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096 e WO 98/24893.

20 Em uma abordagem alternativa, outros utilizaram uma abordagem de "*minilocus*". Na abordagem de *minilocus*, um *locus* de Ig exógena é mimetizado por meio da inclusão de pedaços (genes individuais) do *locus* de Ig. Dessa forma, um ou mais genes de VH, um ou mais genes de DH, um ou mais genes de JH, uma região constante de mu e uma segunda região constante (preferivelmente uma região constante gama) são formados em uma
25 construção para inserção em um animal. Essa abordagem é descrita, por exemplo, nas Patentes U.S. 5.545.807, 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215 e 5.643.763. Vide também as Patentes U.S.
30 5.569.825, 5.877.397, 6.300.129, 5.874.299, 6.255.458 e 7.041.871, cujas descrições são aqui incorporadas por referência em sua totalidade. Vide também EP 0546073, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO

92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, e WO 98/24884. Vide ainda Taylor e outros (1992 *Nuc. Acids. Res.*, 20: 6.287), Chen e outros (1993 *Int. Immunol.* 5: 647), Tuailon e outros (1993 *PNAS USA.* 90: 3.720-4), Choi e outros, (1993 *Nature Genetics* 4: 117), Lonberg e outros (1994 *Nature* 368: 856-859), Taylor e outros (1994 *International Immunology* 6: 579-591) e Tuailon e outros (1995 *J. Immunol.* 154: 6.453-65), Fishwild e outros (1996 *Nature Biotechnology* 14: 845) e Tuailon e outros (2000 *Eur. J. Immunol.* 10: 2.998-3.005).

Em uma modalidade mais particular desta invenção, os anticorpos totalmente humanos são preparados usando esplenócitos humanos sensibilizados *in vitro* (Boerner e outros 1991. *J. Immunol.* 147: 86-95).

Em uma modalidade mais particular desta invenção, os anticorpos totalmente humanos são preparados por clonagem do repertório (Persson e outros 1991. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 2.432-2.436; Huang e Stollar 1991. *J. Immunol. Methods* 141: 227-236). Além disso, a U.S. 5.798.230 descreve a preparação de anticorpos humanos monoclonais por células humanas B, em que as células B produtoras de anticorpo humano são imortalizadas por infecção com um vírus de Epstein-Barr, ou um derivado dos mesmo, que expressa o antígeno 2 nuclear do vírus de Epstein-Barr ("EBNA2"), uma proteína necessária à imortalização. A função de EBNA2 é subsequentemente desligada, resultando em um aumento na produção de anticorpo.

Outros métodos para a produção de anticorpos totalmente humanos envolvem o uso de animais não-humanos que possuem *loci* de Ig endógena inativados e são transgênicos para os genes não rearranjados da cadeia pesada e da cadeia leve de anticorpo humano. Esses animais transgênicos podem ser imunizados com células T ativadas ou com a proteína D1.1 (U.S. 5.474.771, 6.331.433 e 6.455.044), e podem ser gerados hibridomas por células B deles derivadas. Os detalhes desses métodos são descritos na técnica. Vide, por exemplo, várias publicações/patentes em relação a camundongos transgênicos que contêm miniloci de Ig humana, incluindo U.S. 5.789.650; as várias publicações/patentes com relação aos camundon-

gos XENOMOUSE®, incluindo U.S. 6.075.181, 6.150.584 e 6.162.963; Green, 1997, *Nature Genetics* 7: 13-21; Mendez, 1997, *Nature Genetics* 15: 146-56; e as várias publicações/patentes em relação aos camundongos "transômicos", incluindo EP 843961 e Tomizuka, 1997, *Nature Genetics* 16: 1.433-43.

As proteínas de ligação de CD154 e os anticorpos anti-CD154 da presente invenção também estão relacionados às proteínas de ligação ou aos anticorpos de bloqueio cruzado, ou às proteínas de ligação ou aos anticorpos que se ligam ao mesmo epitopo, ou que se ligam a um epitopo intimamente relacionado ou sobreposto, que qualquer um dos anticorpos aqui descritos. Uma proteína de ligação ou um anticorpo de bloqueio cruzado pode inibir ou bloquear competitivamente a ligação de qualquer um dos anticorpos aqui descritos. Em certas modalidades, a invenção fornece proteínas de ligação de CD154 e anticorpos anti-CD154 que se ligam ao mesmo epitopo que um anticorpo humanizado que compreende uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13 e que compreendem uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 15 (Fab e fragmentos Fab' de 342), e que exibem propriedades de ligação de CD154 similares em ensaios de competição às do anticorpo anti-CD154 5c8, como aqui descrito. Em outras modalidades, a invenção fornece proteínas de ligação de CD154 e anticorpos anti-CD154 que se ligam ao mesmo epitopo que um anticorpo humanizado que compreende uma sequência do domínio V_L de acordo com a SEQ ID NO: 58, e uma sequência do domínio V_H de acordo com a SEQ ID NO: 60 (sequências variáveis do anticorpo 338), e que exibem propriedades de ligação de CD154 similares em ensaios de competição às do anticorpo anti-CD154 5c8, como aqui descrito.

Em certas modalidades da presente invenção, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, exibe alta afinidade por CD154 humano. Por exemplo, em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154 se dissocia do CD154 humano (CD40L humano) com uma K_D na faixa de 50 nM a 1 pM, inclusive, como determinado por ressonância de plasmônio de superfície (por exemplo, Biacore®). Por exemplo,

a K_D para CD154 humano pode ser de 25 nM a 1 pM, 10 nM a 1 pM, 5 nM a 1 pM, 1 nM a 1 pM, 0,5 nM a 1 pM, 0,1 nM a 1 pM, 75 pM a 1 pM, 50 pM a 1 pM, 20 pM a 1 pM, ou até mesmo 10 pM a 1 pM. Em outras modalidades, uma proteína de ligação de CD154 da presente invenção se dissocia do
5 CD154 humano com uma K_D na faixa de 500 pM a 1 pM, inclusive, como determinado por ressonância de plasmônio de superfície (por exemplo, Biacore®). Em algumas modalidades, a K_D para CD154 humano é de menos de 50 pM. Por exemplo, em algumas das modalidades da presente invenção, uma proteína de ligação de CD154 se dissocia do CD154 humano com uma
10 K_D que é de menos de 20 pM. Em algumas das modalidades da presente invenção, uma proteína de ligação de CD154 se dissocia do CD154 humano com uma K_D que é de menos de 10 pM. Em certas modalidades, uma proteína de ligação de CD154 da invenção se liga ao CD154 com alta afinidade, mas não desloca CD154 ligado de CD40. A afinidade do anticorpo pode ser
15 aumentada por métodos conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Clark e outros 2006 *Protein Sci.* 15 (5): 949-60, que descreve o aumento da afinidade de um anticorpo com o uso de design computacional baseado na estrutura, e Chao e outros 2006 *Nat. Protoc.* 1: 755-768, que descreve métodos de isolamento e produção por engenharia genética de scFvs com propriedades
20 desejadas com o uso de exibição em superfície de levedura).

Quando for desejado aumentar a afinidade de anticorpos da invenção que contêm uma ou mais das CDRs mencionadas acima, esses anticorpos com afinidade aumentada podem ser obtidos por vários protocolos de amadurecimento de afinidade, incluindo, sem limitação, a manutenção
25 como CDRs (Yang e outros, *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), embaralhamento de cadeias (Marks e outros, *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), o uso de cepas de mutação de *E. coli.* (Low e outros, *J. Mol. Biol.*, 250, 350-368, 1996), embaralhamento de DNA (*DNA shuffling*) (Patten e outros, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), exibição em fago (Thompson e outros,
30 *J. Mol. Biol.*, 256, 7-88, 1996) e PCR sexual (Cramer, e outros, *Nature*, 391, 288-291, 1998). Todos esses métodos de amadurecimento de afinidade são discutidos por Vaughan e outros (*Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998).

Dessa forma, a invenção também fornece variantes de sequência dos anticorpos da invenção que se ligam especificamente ao CD154. Essas variantes de sequência compreendem uma ou mais substituições semiconservadoras ou conservadoras dentro de sua sequência, e essas substituições preferivelmente não afetam significativamente a atividade desejada do polipeptídeo. As substituições podem ser de ocorrência natural ou podem ser introduzidas, por exemplo, com o uso de mutagênese (por exemplo, Hutchinson e outros, 1978, *J. Biol. Chem.* 253: 6551). Os aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, por exemplo, podem frequentemente ser substituídos uns pelos outros (aminoácidos que possuem cadeias laterais alifáticas). Dessas substituições possíveis, prefere-se que os aminoácidos glicina e alanina sejam usados como substitutos entre eles (na medida em que possuem cadeias laterais relativamente curtas), e que os aminoácidos valina, leucina e isoleucina sejam usados como substitutos entre eles (na medida em que possuem cadeias laterais alifáticas maiores que são hidrofóbicas). Outros aminoácidos que podem frequentemente ser substituídos entre eles incluem, sem limitação:

- fenilalanina, tirosina e triptofano (aminoácidos que possuem cadeias laterais aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que possuem cadeias laterais básicas);
- aspartato e glutamato (aminoácidos que possuem cadeias laterais ácidas);
- asparagina e glutamina (aminoácidos que possuem cadeias laterais de amida); e
- cisteína e metionina (aminoácidos que possuem cadeias laterais que contêm enxofre).

A afinidade de ligação das proteínas de ligação de CD154 da presente invenção, por exemplo, dos anticorpos anti-CD154, também pode ser descrita em termos relativos ou comparada com a afinidade de ligação de um segundo anticorpo que também se liga especificamente ao CD154 (por exemplo, um segundo anticorpo anti-CD154 que é CD154-específico,

que pode ser aqui denominado como um "segundo anticorpo CD154-específico". Em algumas modalidades, o segundo anticorpo CD154-específico pode ser o anticorpo 5c8 (produzido pelo hibridoma depositado com ATCC sob o Nº de Acesso HB 10916, como descrito na Patente U.S. 5.474.771) ou 5c8 humanizado). Em outras modalidades, o segundo anticorpo CD154-específico pode ser qualquer um dos anticorpos da invenção, por exemplo, 342, 381, 338, 294, 295, 300, 335, 303 ou 402 (Figura 12). Consequentemente, certas modalidades da presente invenção estão relacionadas a um anticorpo anti-CD154 que se liga ao CD154 humano com maior afinidade do que o anticorpo 5c8, ou com uma K_D que é menor do que a K_D do anticorpo 5c8. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CD154 da presente invenção também inibe a atividade de CD154 ou bloqueia a interação CD154: CD40 em um grau maior do que o faz um segundo anticorpo CD154-específico, por exemplo, 5c8, em concentrações equimolares. A habilidade relativa de um anticorpo anti-CD154 para bloquear a interação CD154: CD40 pode ser medida por qualquer ensaio disponível como, por exemplo, o ensaio de suprarregulação de ICAM-1 aqui descrito e ensaios de competição por ligação.

Consequentemente, em certas modalidades, as proteínas de ligação de CD154 e os anticorpos anti-CD154 (incluindo fragmentos e derivados de anticorpos) da invenção são úteis para inibição da ligação de CD154 a CD40 e o fazem com alta especificidade, por exemplo, com uma IC_{50} na faixa de 10 pM a 1,5 μ M, inclusive. Em certas modalidades, as proteínas de ligação de CD154 da invenção, por exemplo, os anticorpos, podem ter uma IC_{50} na faixa de 10 pM a 500 pM, 50 pM a 500 pM, 100 pM a 500 pM, 250 pM a 750 pM, 500 pM a 1 μ M, ou 750 pM a 1,5 μ M. Em modalidades adicionais, o anticorpo anti-CD154 não agoniza substancialmente a atividade de CD40 ou ativa a sinalização de CD40. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CD154 da presente invenção antagoniza uma atividade de CD154 ou CD40 ou de ambas.

Certas modalidades da presente invenção, portanto, estão relacionadas às proteínas de ligação de CD154 e aos anticorpos anti-CD154

que se ligam ao CD154 humano com afinidade maior ou igual em relação a um segundo anticorpo CD154-específico (por exemplo, anticorpo 5c8 ou 5c8 humanizado), ou com uma K_D que é menor ou igual à K_D de um segundo anticorpo CD154-específico, em que o anticorpo anti-CD154 não inibe substancialmente a interação CD154: CD40 em relação ao segundo anticorpo CD154-específico. Esses anticorpos podem ser úteis como reagentes de ensaio de ligação e diagnósticos, por exemplo. Anticorpos exemplares que exibem uma alta afinidade por CD154 humano, mas um grau menor de inibição de CD154: CD40, comparado com um segundo anticorpo CD154-específico, são anticorpos 381 e 338 aqui descritos. Por exemplo, a presente invenção fornece anticorpos anti-CD154 que se ligam especificamente ao CD154 humano com afinidade maior ou igual (em relação a um segundo anticorpo CD154-específico, como 5c8 humanizado, por exemplo), mas que bloqueiam a interação CD154: CD40 em um grau menor do que o faz o segundo anticorpo CD154-específico. Em modalidades adicionais, esses anticorpos anti-CD154 que inibem a ligação de CD154 (CD40L) ao CD40 em um grau menor do que o faz um segundo anticorpo CD154-específico também não agonizam substancialmente a atividade de CD40 ou ativam a sinalização de CD40. Por exemplo, esses anticorpos, se administrados em um ensaio de potência *in vitro*, como descrito no Exemplo 7, podem não exibir nenhum antagonismo estatisticamente significativo em relação a um tratamento de controle, ou podem exibir 1%, 2%, 3%, 5% ou 10% de antagonismo, comparados com um controle positivo (por exemplo, ligante de CD154). Vidalain e outros (*The EMBO Journal* (2000) 19: 3.304-3.313) e Pearson e outros (*International Immunology* (2001) 13: 273-283) descrevem a via de sinalização de CD40 e também fornecem ensaios que podem ser usados para determinar se a interação CD154: CD40 é ou não bloqueada ou inibida, e em que grau.

Em algumas modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende pelo menos uma CDR selecionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 5). De preferência, o anticorpo compreende pelo menos duas CDRs

selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 5) e, mais preferivelmente, todas as três dessas CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3.

5 Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD154 da invenção compreende pelo menos uma CDR selecionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 8). De preferência, o anticorpo compreende pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 8) e, mais preferivelmente, todas as três dessas CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3.

10 Em modalidades adicionais, o anticorpo compreende todas as três de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 (SEQ ID NOS: 3-5) e todas as três de CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 (SEQ ID NOS: 6-8).

15 Em modalidades adicionais, o anticorpo anti-CD154 compreende uma sequência de cadeia pesada variável de acordo com qualquer um das SEQ ID NOS: 1, 9, 10 ou 11 e compreende uma sequência de cadeia leve variável de acordo com a SEQ ID NO: 2 ou 14.

20 Em algumas modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende pelo menos uma CDR selecionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 44). De preferência, o anticorpo compreende pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 44) e, mais preferivelmente, todas as três dessas CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3.

25 Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD154 da invenção compreende pelo menos uma CDR selecionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 47). De preferência, o anticorpo compreende pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 47) e, mais preferivelmente, todas as três dessas CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3.

30 Em modalidades adicionais, o anticorpo compreende todas as três de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 (SEQ ID NOS: 42-44) e todas as três de CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 (SEQ ID NOS: 45-47).

Em modalidades adicionais, o anticorpo anti-CD154 compreende uma sequência de cadeia pesada variável de acordo com a SEQ ID NO: 56 e/ou compreende uma sequência de cadeia leve variável de acordo com a SEQ ID NO: 54.

5 Em algumas modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende pelo menos uma CDR selecionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50). De preferência, o anticorpo compreende pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49)
10 e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50) e, mais preferivelmente, todas as três dessas CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3.

Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD154 da invenção compreende pelo menos uma CDR selecionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 53). De preferência, o anticorpo compreende pelo menos duas CDRs selecionadas de CDR-L1 (SEQ
15 ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 53) e, mais preferivelmente, todas as três dessas CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3.

Em certas modalidades, os anticorpos possuem uma sequência complementar que compreende uma ou mais CDRs da cadeia leve de CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, acima, ou uma sequência complementar que compreende uma ou mais CDRs da cadeia pesada ou CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, acima, respectivamente. Dessa forma, em certas modalidades, um anticorpo desta invenção compreende CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ
20 ID NO: 49) ou CDR-H3 (SEQ ID NO: 50) e CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) ou CDR-L3 (SEQ ID NO: 53).

Em modalidades adicionais, o anticorpo compreende todas as três de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 (SEQ ID NOS: 48-50) e todas as três de CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 (SEQ ID NOS: 51-53).

Em modalidades adicionais, o anticorpo anti-CD154 compreende uma sequência de cadeia pesada variável de acordo com a SEQ ID NO: 60 e/ou compreende uma sequência de cadeia leve variável de acordo com a SEQ ID NO: 58.
30

Em certas modalidades, a proteína de ligação de CD154 desta invenção compreende uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 62 e uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 65. Em outras modalidades, a proteína de ligação de CD154 desta invenção
5 compreende uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 63 e uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 66.

Em certas modalidades, a proteína de ligação de CD154 desta invenção compreende uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 68 e uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO:
10 71. Em outras modalidades, a proteína de ligação de CD154 desta invenção compreende uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 69 e uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 72. Em outras modalidades, a proteína de ligação de CD154 compreende uma das sequências de acordo com a SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO:
15 71 ou SEQ ID NO: 72.

Esta invenção também fornece proteínas de ligação de CD154 que preferivelmente compartilham pelo menos 90%, 91%, 92%, 93% ou 94% de identidade com uma proteína de ligação de CD154 da invenção. Mais preferivelmente, uma proteína de ligação de CD154 compartilha pelo menos
20 95%, 96%, 97% ou 98% de identidade. Mais preferivelmente ainda, uma proteína de ligação de CD154 compartilha pelo menos 99%, 99,5%, 99,9% ou mais de identidade com uma proteína de ligação de CD154 da invenção. As proteínas de ligação de CD154 da invenção podem compreender uma sequência do domínio variável que é pelo menos 85% idêntica a um domínio
25 variável da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58 ou SEQ ID NO: 60, ou uma ou mais CDRs dos mesmos.

Outras modalidades da invenção estão relacionadas aos anti-
30 corpos biespecíficos. Anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, de preferência humanos ou humanizados, que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. Eles podem ser usados

isoladamente ou misturados em composições que compreendem populações policlonais. Na presente invenção, uma das especificidades de ligação é para o antígeno de CD154, enquanto a outra especificidade de ligação é para qualquer outro antígeno e, de preferência, para uma proteína ou um receptor ou uma subunidade de receptor da superfície celular. Por exemplo, a outra especificidade de ligação pode ser um ligante selecionado entre albumina sérica humana (HSA), TNF- α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN- γ , CD2, CD4, CD8, CTLA4, LFA1, LFA3 e VLA4.

Em outras modalidades da presente invenção, um anticorpo anti-CD154 compreende um sítio de ligação de ligante genérico. Um ligante genérico (por exemplo, um polipeptídeo) é capaz de ligar membros funcionais de um repertório, independentemente da especificidade do ligante-alvo. Um ligante genérico pode, portanto, ser usado para identificar ou selecionar (por exemplo, como em processos de purificação e rastreamento) membros funcionais de um repertório (por exemplo, uma coleção ou grupo de anticorpos, independentemente das especificidades de ligação de antígeno dos anticorpos). Ligantes genéricos incluem, por exemplo, Proteína A, Proteína G e Proteína L. A pré-seleção de membros de uma biblioteca de fago com ligantes genéricos é ensinada em WO 99/20749.

20 Fragmentos de anticorpo

A presente invenção também está relacionada aos fragmentos de anticorpos anti-CD154 de ligação de antígeno ou de ligação de epitopo. Todos os métodos e reagentes descritos acima com relação aos anticorpos anti-CD154 podem ser usados similarmente para produzir e usar os fragmentos de anticorpos anti-CD154 desta invenção.

Em algumas modalidades desta invenção, os fragmentos de anticorpos anti-CD154 incluem complexos heteroméricos de anticorpos e fusões de anticorpo, tais como anticorpos biespecíficos, anticorpos hemidiméricos, anticorpos multivalentes (isto é, anticorpos tetravalentes) e anticorpos de cadeia única. Um anticorpo hemidimérico é constituído por uma porção Fc e uma porção Fab. Um anticorpo de cadeia única é constituído por regiões variáveis ligadas por espaçadores de proteína em uma cadeia de proteí-

na simples.

Em algumas modalidades desta invenção, os fragmentos de anticorpos anti-CD154 desta invenção também podem incluir proteínas que contêm uma ou mais cadeias leves e/ou cadeias pesadas de imunoglobulina, por exemplo, monômeros e homo- ou heteromultímeros (por exemplo, dímeros ou trímeros) dessas cadeias, em que essas cadeias estão opcionalmente ligadas por dissulfeto ou de algum outro modo entrecruzadas. Esses anticorpos podem ser capazes de ligação a um ou mais antígenos.

Em certas modalidades, a presente invenção inclui fragmentos de ligação de antígeno de anticorpos inteiros, tais como fragmentos de anticorpos Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, F(v), Fd, dAb, *diacorpo*, *minicorpo* e *nanocorpo*. A presente invenção também está relacionada a fragmentos que compreendem apenas um domínio variável único, por exemplo, um domínio V_H ou V_L, ou a um fragmento que compreende apenas domínios da cadeia pesada ou da cadeia leve. Os fragmentos podem ser humanizados ou totalmente humanos. A presente invenção também inclui fragmentos de ligação de antígeno que são feitos de estruturas alternativas (vide, por exemplo, Binz *supra* e Hosse *supra*) ou que compreendem uma estrutura universal. A presente invenção também está relacionada aos conjugados que compreendem qualquer fragmento de ligação de antígeno ou proteína de ligação de CD154 que se liga especificamente ao CD154 conjugada covalentemente ou não covalentemente, ou direta ou indiretamente, a uma porção funcional como, por exemplo, uma proteína veículo ou PEG, por exemplo.

Os anticorpos anti-CD154 da presente invenção incluem anticorpos divalentes. Dessa forma, em certas modalidades, a invenção está relacionada a um fragmento de anticorpo anti-CD154 divalente que compreende duas cadeias pesadas de anticorpo e pelo menos uma molécula de polímero em ligação covalente, cada cadeia pesada estando ligada covalentemente à outra por pelo menos uma ponte intercadeias não dissulfeto que liga o átomo de enxofre de um resíduo de cisteína em uma cadeia ao átomo de enxofre de um resíduo de cisteína na outra cadeia, os resíduos de cisteí-

na estando localizados fora do domínio da região variável de cada cadeia, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma ponte intercadeias não dissulfeto contém uma molécula de polímero ligada covalentemente. O termo "não dissulfeto", como aqui usado, visa significar que pontes S-S, por exemplo, do tipo normalmente encontrado em anticorpos, estão excluídas. Uma ponte intercadeias do tipo presente em um fragmento de acordo com a invenção pode, no entanto, ainda estar ligada a uma cadeia pesada por meio de uma ligação a-S-S, como aqui descrito posteriormente. Em geral, cada molécula de polímero no fragmento de anticorpo divalente de acordo com a invenção forma parte de uma ponte intercadeias. Cada ponte serve para ligar duas cadeias pesadas e, em cada cadeia, estará ligada covalentemente a um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína. A ligação covalente será geralmente uma ligação dissulfeto ou, em modalidades particulares, uma ligação enxofre-carbono. Para estruturas exemplares de um anticorpo divalente, vide WO 99/64460 e WO 05/061005.

A invenção também fornece um anticorpo anti-CD154 que é um anticorpo monovalente ou fragmento monovalente de ligação de antígeno. Como aqui usado, o termo "monovalente" significa que certo anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno (por exemplo, Fv, um scFv de cadeia única, dAb, Fab, Fab', Fd, scFab, scFab-C etc.) pode se ligar apenas a uma única molécula de seu alvo. Anticorpos de ocorrência natural são geralmente divalentes, na medida em que possuem dois braços funcionais de ligação de antígeno, cada um compreendendo um domínio V_H e um domínio V_L . Um anticorpo divalente pode se ligar a duas moléculas separadas do mesmo antígeno, quando o impedimento estérico não for problema. Em contraste, um anticorpo "monovalente" possui um sítio de ligação de antígeno para um alvo. O domínio de ligação de antígeno de um anticorpo monovalente pode compreender um domínio V_H e um domínio V_L ou pode compreender apenas um domínio variável único de imunoglobulina, isto é, um domínio V_H ou um domínio V_L , que possui a capacidade de se ligar ao CD154, sem a necessidade de um domínio V_L ou V_H correspondente, respectivamente. Um anticorpo monovalente exemplar é um fragmento Fd que compreende um domí-

nio variável único de imunoglobulina e que só pode se ligar a uma molécula de antígeno de CD154. Um anticorpo monovalente não possui a capacidade de se ligar de forma cruzada às moléculas de um único antígeno.

Esta invenção fornece um anticorpo anti-CD154, em que o anti-
5 corpo se liga especificamente a um epítipo ao qual um fragmento humanizado Fab ou Fab' com uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 12 ou 13, respectivamente, e com uma sequência da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 15 se liga especificamente. Em certas modalidades, um anticorpo desta invenção é um fragmento de anticorpo com
10 uma sequência de cadeia pesada variável de acordo com a SEQ ID NO: 1, 9, 10 ou 11 e com uma sequência de cadeia leve variável de acordo com a SEQ ID NO: 2 ou 14. Em outras modalidades, o anticorpo desta invenção é um fragmento de anticorpo com uma sequência da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 12 ou 13 e uma sequência da cadeia leve de acordo com
15 a SEQ ID NO: 15.

Em certas modalidades, a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compreende ou consiste em uma sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e uma sequência da cadeia pesada da SEQ ID NO: 13. Em certas modalidades, a proteína de ligação de CD154 ou o anticorpo compre-
20 ende ou consiste em uma sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e uma sequência da cadeia pesada da SEQ ID NO: 12.

Em modalidades alternativas, a invenção fornece um fragmento de anticorpo que compreende uma sequência de cadeia pesada variável de acordo com a SEQ ID NO: 56 e que compreende uma sequência de cadeia
25 leve variável de acordo com a SEQ ID NO: 54. Em outras modalidades, o anticorpo desta invenção é um fragmento de anticorpo que compreende uma sequência de cadeia pesada variável de acordo com a SEQ ID NO: 60 e que compreende uma sequência de cadeia leve variável de acordo com a SEQ ID NO: 58.

30 Em uma modalidade, esta invenção fornece um fragmento Fab' ou um fragmento $F(ab')_2$ ou um fragmento $F(ab')_3$ que se liga especificamente ao CD154. Esse fragmento Fab' ou $F(ab')_2$ ou $F(ab')_3$ pode ser humaniza-

do e pode ter uma sequência da cadeia pesada que compreende ou consiste na sequência da SEQ ID NO: 13, e pode ter uma sequência da cadeia leve que compreende ou consiste na sequência da SEQ ID NO: 15.

5 Em algumas modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que não possui um domínio Fc. Um anticorpo ou fragmento deficiente em Fc desse tipo pode ser monovalente, divalente ou ainda multivalente.

Esta invenção também fornece anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo ao qual os fragmentos Fab' ou F(ab')₂ ou F(ab')₃ descritos acima se ligam especificamente. Esses anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser identificados por um ensaio de bloqueio cruzado, como aqui descrito (Exemplo 9). Esses anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados, recombinantes ou sintéticos, e podem ser anexados a uma segunda molécula para formar um conjugado de anticorpo.

10
15

Anticorpos com função efetora reduzida

A interação de anticorpos e complexos anticorpo-antígeno com células do sistema imunológico desencadeia diversas respostas, aqui denominadas funções efetoras. Os anticorpos IgG ativam vias efetoras do sistema imunológico por ligação aos membros da família de receptores da superfície celular Fc γ e ao C1q do sistema complemento. A ligação de proteínas efetoras por anticorpos agrupados desencadeia diversas respostas, incluindo a liberação de citocinas inflamatórias, regulação da produção de antígeno, endocitose e morte celular. Em algumas aplicações clínicas, essas respostas são cruciais para a eficácia de um anticorpo monoclonal. Em outras, elas provocam efeitos colaterais indesejados como, por exemplo, inflamação e a eliminação de células que abrigam antígeno. Conseqüentemente, a presente invenção ainda está relacionada às proteínas de ligação de CD154, incluindo anticorpos, com funções efetoras alteradas, por exemplo, reduzi-

20
25
30

das. Significativamente, função efetora reduzida não reduz necessariamente a habilidade de um anticorpo anti-CD154 para inibir uma ou várias doenças por meio de bloqueio da interação CD154-CD40 (vide WO 05/03175, que é

aqui incorporada por referência em sua totalidade).

Anticorpos anti-CD154 com função efetora diminuída (por exemplo, funções efetoras mediadas por Fc; vide abaixo) são particularmente desejáveis para uso em indivíduos nos quais existe potencial para atividade tromboembólica indesejável. Adicionalmente, a função efetora diminuída de anticorpos anti-CD154 pode diminuir ou eliminar outros efeitos colaterais indesejados potenciais de terapias com o anticorpo anti-CD154, por exemplo, eliminação de células T ativadas e de outras populações de células induzidas para expressar CD154 ou ativação de monócitos/macrófagos dependente de Fc.

A função efetora de um anticorpo anti-CD154 da presente invenção pode ser determinada com a utilização de um entre muitos ensaios conhecidos. A função efetora do anticorpo anti-CD154 pode ser reduzida em relação a um segundo anticorpo anti-CD154. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo anti-CD154 pode ser qualquer anticorpo que se liga ao CD154 especificamente. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo anti-CD154 pode ser o anticorpo 5c8 (produzido pelo hibridoma depositado com ATCC sob o N° de Acesso HB 10916, como descrito na Patente U.S. 5.474.771) ou 5c8 humanizado. Em outras modalidades, o segundo anticorpo CD154-específico pode ser qualquer um dos anticorpos da invenção, por exemplo, 342, 381, 338, 294, 295, 300, 335, 303 ou 402 (Figura 12). Em outras modalidades, nas quais o anticorpo anti-CD154 de interesse foi modificado para reduzir a função efetora, o segundo anticorpo anti-CD154 pode ser a versão não-modificada ou parental do anticorpo.

A função efetora de um anticorpo anti-CD154 da presente invenção também pode ser determinada, por exemplo, por medida do nível de agregação ou ativação plaquetária causada por tratamento com o anticorpo anti-CD154 em relação a um anticorpo de controle. Em algumas modalidades, portanto, os anticorpos anti-CD154 da presente invenção não medeiam ou não aumentam a agregação ou ativação plaquetária em um ensaio-padrão de agregação ou ativação plaquetária. Em outras modalidades, os anticorpos anti-CD154 medeiam um nível menor de agregação ou ativação

plaquetária em relação a um segundo anticorpo anti-CD154 (por exemplo, 5c8 ou 5c8 humanizado).

Funções efetoras exemplares incluem ligação ao receptor Fc, fagocitose, apoptose, respostas pró-inflamatórias, infrarregulação de receptores da superfície celular (por exemplo, receptor de célula B; BCR) etc. Outras funções efetoras incluem citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), pela qual os anticorpos se ligam aos receptores Fc em células T citotóxicas, células *natural killer* (NK) ou macrófagos, levando à morte celular, e citotoxicidade dependente de complemento (CDC), que é a morte celular induzida por meio da ativação da cascata do complemento (revisada em Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997); Ward e Ghetie, *Therapeutic Immunol.* 2: 77-94 (1995); e Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991)). Essas funções efetoras geralmente exigem que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável de anticorpo), e podem ser avaliadas com o uso de ensaios-padrão que são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, WO 05/018572, WO 05/003175 e Patente U.S. 6.242.195).

As funções efetoras podem ser evitadas com a utilização de fragmentos de anticorpos desprovidos do domínio Fc como, por exemplo, Fab, Fab₂ ou Fv de cadeia única. Uma alternativa foi a utilização do anticorpo do subtipo IgG4, que se liga ao Fc γ RI, mas que se liga fracamente ao C1q e Fc γ RII e RIII. O subtipo IgG2 também apresenta ligação reduzida aos receptores Fc, mas retém ligação significativa ao alótipo H131 de Fc γ RIII e ao C1q. Dessa forma, são necessárias alterações adicionais na sequência de Fc para eliminar a ligação a todos os receptores Fc e ao C1q.

Várias funções efetoras de anticorpo, incluindo ADCC, são mediadas por receptores Fc (FcRs), que se ligam à região Fc de um anticorpo. A afinidade de um anticorpo para um FcR em particular e, portanto, a atividade efetora mediada pelo anticorpo, podem ser moduladas por alteração da sequência de aminoácidos e/ou por modificações pós-tradução da região Fc e/ou constante do anticorpo.

FcRs são definidos por sua especificidade por isótipos de imu-

noglobulina; receptores Fc para anticorpos IgG são chamados Fc γ R, para IgE chamados Fc ϵ R, para IgA chamados Fc α R, e assim por diante. Foram identificadas três subclasses de Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16). Tanto Fc γ RII quanto Fc γ RIII possuem dois tipos: Fc γ RIIA (CD32) e Fc γ RIIB (CD32); e Fc γ RIIIA (CD16a) e Fc γ RIIIB (CD16b). Como cada subclasse de Fc γ R é codificada por dois ou três genes, e a estrutura alternativa de RNA leva a múltiplos transcritos, existe uma ampla diversidade nas isoformas de Fc γ R. Por exemplo, Fc γ RII (CD32) inclui as isoformas IIa, IIb1, IIb2 IIb3 e IIc.

10 O sítio de ligação em anticorpos humanos e murinos para Fc γ R foi mapeado previamente na denominada "região de dobradiça inferior", que consiste nos resíduos 233-239 (numeração pelo índice EU como em Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edição Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), Woof e outros *Molec. Immunol.* 23: 319-330 (1986); Duncan e outros *Nature* 332: 15 563 (1988); Canfield e Morrison, *J. Exp. Med.* 173: 1.483-1.491 (1991); Chappel e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 9.036-9.040 (1991)). Dos resíduos 233-239, P238 e S239 estão entre aqueles citados como possivelmente estando envolvidos na ligação. Outras áreas citadas previamente como possivelmente envolvidas na ligação ao Fc γ R são: G316-K338 (IgG hu- 20 mana) para Fc γ RI humano (somente por comparação de seqüências; nenhum mutante de substituição foi avaliado) (Woof e outros *Molec Immunol.* 23: 319-330 (1986)); K274-R301 (IgG1 humana) para Fc γ RIII humano (com base em peptídeos) (Sarmay e outros *Molec. Immunol.* 21: 43-51 (1984)); e 25 Y407-R416 (IgG humana) para Fc γ RIII humano (com base em peptídeos) (Gergely e outros *Biochem. Soc. Trans.* 12: 739-743 (1984) e Shields e outros *J. Biol. Chem.* 276: 6.591-6.604 (2001), Lazar G.A. e outros *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 4.005-4.010 (2006). Esses e outros trechos ou regiões de resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação de FcR podem ser 30 evidentes para aqueles versados na técnica a partir de um exame das estruturas cristais de complexos Ig-FcR (vide, por exemplo, Sondermann e outros 2000 *Nature* 406 (6.793): 267-73 e Sondermann e outros 2002 *Biochem.*

Soc. Trans. 30 (4): 481-6). Conseqüentemente, os anticorpos anti-CD154 da presente invenção incluem modificações de um ou mais dos resíduos mencionados anteriormente.

Outras abordagens conhecidas para a redução da função efetora de mAb incluem a mutação de aminoácidos na superfície do mAb que estão envolvidos em interações de ligação efectoras (Lund, J., e outros (1991) *J. Immunol.* 147 (8): 2.657-62; Shields, R. L. e outros (2001) *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6.591-604; e a utilização de combinações de segmentos de sequência de subtipo diferente (por exemplo, combinações IgG2 e IgG4) para gerar uma redução maior da ligação aos receptores Fc γ do que um dos subtipos isoladamente (Armour e outros, *Eur. J. Immunol.* (1999) 29: 2.613-1624; *Mol. Immunol.* 40 (2003) 585-593).

Um grande número de variantes de Fc que possuem afinidades alteradas e/ou reduzidas para alguns ou todos os subtipos do receptor Fc (e, dessa forma, para as funções efectoras) é conhecido na técnica. Vide, por exemplo, as Patentes U.S. 2007/0224188, U.S. 2007/0148171, U.S. 2007/0048300, U.S. 2007/0041966, U.S. 2007/0009523, U.S. 2007/0036799, U.S. 2006/0275283, U.S. 2006/0235208, U.S. 2006/0193856, U.S. 2006/0160996, U.S. 2006/0134105, U.S. 2006/0024298, U.S. 2005/0244403, U.S. 2005/0233382, U.S. 2005/0215768, U.S. 2005/0118174, U.S. 2005/0054832, U.S. 2004/0228856, U.S. 2004/132101, U.S. 2003/158389; vide também as Patentes U.S. 7.183.387, 6.737.056, 6.538.124, 6.528.624, 6.194.551, 5.624.821, 5.648.260.

Na CDC, o complexo anticorpo-antígeno se liga ao complemento, resultando na ativação da cascata do complemento e na geração do complexo de ataque à membrana. A ativação da via clássica do complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema complemento (C1q) aos anticorpos (da subclasse adequada) que estão ligados ao seu antígeno cognato; dessa forma, a ativação da cascata do complemento é regulada, em parte, pela afinidade de ligação da imunoglobulina à proteína C1q. Para ativar a cascata do complemento, é necessário que C1q se ligue a pelo menos duas moléculas de IgG1, IgG2 ou IgG3, mas a apenas uma molécula

de IgM, anexada ao alvo antigênico (Ward e Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2: 77-94 (1995) p. 80). Para avaliar a ativação do complemento, pode ser realizado um ensaio de CDC, por exemplo, como descrito em Gazzano-Santoro e outros, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

5 Foi proposto que vários resíduos da molécula de IgG estão envolvidos na ligação ao C1q, incluindo os resíduos Glu318, Lys320 e Lys322 no domínio CH2, o resíduo de aminoácido 331 localizado em uma volta próxima à mesma fita beta, os resíduos Lys235 e Gly237 localizados na região de dobradiça inferior, e os resíduos 231 a 238 localizados na região do terminal N do domínio CH2 (vide, por exemplo, Xu e outros, *J. Immunol.* 150: 152A (Resumo) (1993), WO 94/29351; Tao e outros, *J. Exp. Med.*, 178: 661-667 (1993); Brekke e outros, *Eur. J. Immunol.*, 24: 2.542-47 (1994); Burton e outros; *Nature*, 288: 338-344 (1980); Duncan e Winter, *Nature* 332: 738-40 (1988); Idusogie e outros *J. Immunol.* 164: 4.178-4.184 (2000; Patente U.S. 15 5.648.260 e Patente U.S. 5.624.821). Como um exemplo em IgG1, duas mutações na região do terminal COOH do domínio CH2 de IgG1 humana - K322A e P329A – não ativam a via da CDC, e foi demonstrado que resultam em um aumento de mais de 100 vezes da ligação ao C1q (Patente U.S. 6.242.195).

20 Dessa forma, em certas modalidades da invenção, um ou mais desses resíduos podem ser modificados, substituídos ou removidos, ou um ou mais resíduos de aminoácidos podem ser inseridos, de forma a diminuir a atividade da CDC dos anticorpos de CD154 aqui fornecidos. Por exemplo, em algumas modalidades, pode ser desejável reduzir ou eliminar a função 25 efetora (ou as funções efetoras) dos anticorpos em questão a fim de reduzir ou eliminar o potencial de respostas imunológicas de ativação adicionais. Anticorpos com função efetora diminuída também podem reduzir o risco de acidentes tromboembólicos em indivíduos que recebem os anticorpos.

30 Em certas outras modalidades, a presente invenção fornece um anticorpo anti-CD154 que exhibe ligação reduzida a um ou mais receptores FcR, mas que mantém sua habilidade para se ligar ao complemento (por exemplo, em um grau similar ou, em algumas modalidades, em um grau

menor do que um anticorpo anti-CD154 nativo, não-variante ou parente). Consequentemente, um anticorpo anti-CD154 da presente invenção pode se ligar e ativar o complemento, exibindo ligação reduzida a um FcR como, por exemplo, FcγRIIIa (por exemplo, FcγRIIIa expresso em plaquetas). Um anticorpo desse tipo com ligação reduzida ou ausente ao FcγRIIIa (por exemplo, FcγRIIIa expresso em plaquetas, por exemplo), mas que pode se ligar ao C1q e ativar a cascata do complemento em pelo menos algum grau, reduzirá o risco de acidentes tromboembólicos mantendo, talvez, funções efetoras desejáveis. Em modalidades alternativas, um anticorpo anti-CD154 da presente invenção exibe ligação reduzida a um ou mais FcRs, mas mantém sua habilidade de se ligar a um ou mais outros FcRs. Vide, por exemplo, as Patentes U.S. 2007-0009523, 2006-0194290, 2005-0233382, 2004-0228856, e 2004-0191244, que descrevem várias modificações de aminoácidos que geram anticorpos com ligação reduzida ao FcRI, FcRII e/ou FcRIII, bem como substituições de aminoácidos que resultam em ligação aumentada a um FcR, mas ligação diminuída a outro FcR.

Consequentemente, as funções efetoras que envolvem a região constante de um anticorpo anti-CD154 podem ser moduladas por alteração de propriedades da região constante, e da região Fc em particular. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD154 que possui função efetora reduzida é comparado com um segundo anticorpo com função efetora e que pode ser um anticorpo não-variante, nativo ou parente (por exemplo, anticorpo 342 ou anticorpo 5c8, que é descrito na Patente U.S. 5.474.771) que compreende uma região constante ou Fc nativa que medeia a função efetora. Em modalidades particulares, a modulação da função efetora inclui situações nas quais uma atividade é abolida ou está completamente ausente.

Uma região Fc ou constante da sequência nativa compreende uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos de uma região Fc ou da cadeia constante encontrada na natureza. De preferência, uma molécula de controle usada para avaliar a função efetora relativa compreende a região Fc do mesmo tipo/subtipo que possui o anticorpo de teste ou variante. Uma região Fc ou constante variante ou alterada compre-

ende uma sequência de aminoácidos que difere daquela de uma região da cadeia pesada da sequência nativa em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido (como, por exemplo, uma modificação pós-tradução, uma substituição, inserção ou eliminação de aminoácido). Conseqüentemente, a
5 região constante variante pode conter uma ou mais substituições, eliminações ou inserções de aminoácidos que resultam em modificações pós-tradução alteradas incluindo, por exemplo, um padrão de glicosilação alterado. Um anticorpo ou uma região Fc parente é, por exemplo, uma variante que possui função efetora normal usada para construir uma região constante
10 (isto é, Fc) que possui função efetora alterada, por exemplo, reduzida.

Anticorpos com função efetora (funções efetoras) alterada (por exemplo, reduzida ou eliminada) podem ser gerados por engenharia genética ou pela produção de anticorpos com regiões constantes, Fc ou da cadeia pesada variantes. A tecnologia de DNA recombinante e/ou as condições
15 da cultura de células e expressão podem ser usadas para produzir os anticorpos com função e/ou atividade alterada. Por exemplo, a tecnologia de DNA recombinante pode ser usada para criar por engenharia genética uma ou mais substituições, eliminações ou inserções de aminoácidos em regiões (como, por exemplo, regiões Fc ou constantes) que afetam a função
20 do anticorpo, incluindo funções efetoras. Alternativamente, alterações de modificações pós-tradução como, por exemplo, padrões de glicosilação (vide abaixo), podem ser obtidas por manipulação da célula hospedeira e das condições de cultura de células e de expressão pelas quais o anticorpo é produzido.

25 Alterações de aminoácidos, tais como substituições de aminoácidos, podem alterar a função efetora dos anticorpos anti-CD154 da presente invenção, sem afetar a afinidade de ligação de antígeno. As substituições de aminoácidos descritas acima (por exemplo, Glu318, Kys320, Lys332, Lys235, Gly237, K332 e P329), por exemplo, podem ser usadas para gerar
30 anticorpos com função efetora reduzida.

Em outras modalidades, podem ser feitas substituições de aminoácidos para um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos: 234,

235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322 da região constante da cadeia pesada (vide as Patentes U.S. 5.624.821 e U.S. 5.648.260). Essas substituições podem alterar a função efetora, retendo a atividade de ligação de antígeno. Uma alteração em um ou mais dos aminoácidos 234, 235, 236 e 237 pode
5 diminuir a afinidade de ligação da região Fc pelo receptor FcγRI, quando comparados com um anticorpo não-modificado ou não-variante. Os resíduos de aminoácido 234, 236 e/ou 237 podem ser substituídos com alanina, por exemplo, e o resíduo de aminoácido 235 pode ser substituído com glutamina, por exemplo. Em outra modalidade, um anticorpo IgG1anti-CD154 pode
10 compreender uma substituição de Leu na posição 234 com Ala, uma substituição de Leu na posição 235 com Glu, e uma substituição de Gly na posição 237 com Ala.

Adicional ou alternativamente, os resíduos de aminoácidos de Fc em 318, 320 e 322 podem ser alterados. Esses resíduos de aminoácidos,
15 que são altamente conservados em IgGs de camundongo e humanas, medeiam a ligação de complemento. Foi demonstrado que a alteração desses resíduos de aminoácidos reduz a ligação de C1q, mas não altera a ligação de antígeno, ligação de proteína A ou a habilidade do Fc para se ligar a macrófagos de camundongo.

20 Em outra modalidade, um anticorpo anti-CD154 da presente invenção é uma imunoglobulina IgG4 que compreende substituições que reduzem ou eliminam a função efetora. A porção Fc de IgG4 de um anticorpo anti-CD154 da invenção pode compreender uma ou mais das seguintes substituições: substituição de prolina para glutamato no resíduo 233, alanina
25 ou valina para fenilalanina no resíduo 234, e alanina ou glutamato para leucina no resíduo 235 (numeração EU, Kabat, E. A. e outros (1991), *supra*). Além disso, a remoção do sítio de glicosilação ligada ao N na região Fc da IgG4 por substituição de Ala para Asn no resíduo 297 (numeração EU) pode reduzir ainda mais a função efetora e eliminar qualquer atividade efetora
30 residual que possa existir. Outro mutante de IgG4 exemplar com função efetora reduzida é a variante do subtipo IgG4 que contém as mutações S228P e L235E (mutação PE) na região constante da cadeia pesada. Essa mutação

resulta em função efetora reduzida. Vide as Patentes U.S. 5.624.821 e U.S. 5.648.260. Outra mutação exemplar no contexto de IgG4 que reduz a função efetora é S228P/T229A, como aqui descrito.

5 Outras alterações exemplares da sequência de aminoácidos na região constante incluem, sem limitação, a mutação Ala-Ala descrita por Bluestone e outros (vide WO 94/28027 e WO 98/47531; vide também Xu e outros 2000 *Cell. Immunol.* 200; 16-26). Dessa forma, em certas modalidades, podem ser usados anticorpos anti-CD154 com mutações dentro da região constante, incluindo a mutação Ala-Ala, para reduzir ou abolir a função
10 efetora. De acordo com essas modalidades, a região constante de um anticorpo anti-CD154 compreende uma mutação para uma alanina na posição 234 ou uma mutação para uma alanina na posição 235. Adicionalmente, a região constante pode conter uma mutação dupla: uma mutação para uma alanina na posição 234 e uma segunda mutação para uma alanina na posi-
15 ção 235.

Em uma modalidade, um anticorpo anti-CD154 compreende uma estrutura de IgG4, em que a mutação Ala-Ala descreveria uma mutação (ou mutações) de fenilalanina para alanina na posição 234 e/ou uma mutação de leucina para alanina na posição 235. Em outra modalidade, o anti-
20 corpo anti-CD154 compreende uma estrutura de IgG1, em que a mutação Ala-Ala descreveria uma mutação (ou mutações) de leucina para alanina na posição 234 e/ou uma mutação de leucina para alanina na posição 235. Um anticorpo anti-CD154 pode alternativa ou adicionalmente carregar outras mutações, incluindo a mutação pontual K322A no domínio CH2 (Hezareh e
25 outros 2001 *J. Virol.* 75: 12.161-8).

Outras substituições de aminoácidos exemplares são fornecidas em WO 94/29351 (que é aqui incorporada por referência em sua totalidade), que cita anticorpos que possuem mutações na região do terminal N do domínio CH2 que alteram a habilidade dos anticorpos para se ligar ao FcRI, diminuindo, dessa forma, a habilidade dos anticorpos para se ligar ao C1q, o
30 que, por sua vez, diminui a habilidade dos anticorpos para fixar complemento. Vide também Cole e outros (*J. Immunol.* (1997) 159: 3.613-3.621), que

descreve mutações nas regiões CH2 superiores em IgG2 que resultam em menor ligação de FcR.

Métodos para a geração de qualquer uma das variantes de anticorpo mencionadas anteriormente compreendendo substituições de aminoácidos são bem-conhecidos na técnica. Esses métodos incluem, sem limitação, preparação por mutagênese sítio-dirigida (ou mediada por oligonucleotídeo), mutagênese por PCR e mutagênese com cassete de uma molécula de DNA preparada que codifica o anticorpo ou pelo menos a região constante do anticorpo.

10 A mutagênese sítio-dirigida é bem-conhecida na técnica (vide, por exemplo, Carter e outros *Nucleic Acids Res.* 13: 4.431-4.443 (1985) e Kunkel e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 488 (1987)).

A mutagênese por PCR também é adequada à produção de variantes de sequências de aminoácidos do polipeptídeo de partida. Vide Higu-
15 chi, em "PCR Protocols", páginas 177-183 (Academic Press, 1990); e Vallette e outros, *Nuc. Acids Res.* 17: 723-733 (1989).

Outro método para a preparação de variantes de sequência, mutagênese por cassete, se baseia na técnica descrita por Wells e outros, *Gene* 34: 315-323 (1985).

20 Outra modalidade da presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 com função efetora reduzida em que a região Fc do anticorpo, ou porções desta, é trocada por uma região Fc (ou com porções desta) que possuem atividade de indução efetora naturalmente reduzida. Por exemplo, a região constante da IgG4 humana exibe ativação do complemen-
25 to reduzida ou ausente. Além disso, as diferentes moléculas de IgG diferem em sua afinidade de ligação por FcR, o que pode ser causado, pelo menos em parte, pelo comprimento e flexibilidade variáveis das regiões de dobradiça das IgGs (que diminui na ordem IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2). Por exemplo, IgG4 exibe ligação reduzida ou ausente ao FcγRIIIa. Para exemplos de
30 moléculas quiméricas e regiões constantes quiméricas, vide, por exemplo, Gillies e outros (*Cancer Res.* 1999, 59: 2.159-2.166) e Mueller e outros (*Mol. Immunol.* 1997, 34: 441-452).

A invenção também está relacionada aos anticorpos anti-CD154 com função efetora reduzida nos quais a região Fc está completamente ausente. Tais anticorpos também podem ser chamados de derivados de anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno da presente invenção. Esses
5 derivados e fragmentos podem ser fundidos a sequências de proteínas não anticorpo ou estruturas não-protéicas, especialmente estruturas projetadas para facilitar a liberação e/ou biodisponibilidade quando administrados a um animal, por exemplo, um ser humano (vide abaixo).

Como discutido acima, alterações na região de dobradiça também afetam as funções efetoras. Por exemplo, a eliminação da região de dobradiça pode reduzir a afinidade por receptores Fc e pode reduzir a ativação do complemento (Klein e outros 1981 *PNAS USA* 78: 524-528). A presente descreve, portanto, também está relacionada aos anticorpos com alterações na região de dobradiça.
10

Em modalidades particulares, os anticorpos da presente invenção podem ser modificados para inibir a citotoxicidade dependente de complemento (CDC). A atividade da CDC modulada pode ser obtida por introdução de uma ou mais substituições, inserções ou eliminações de aminoácidos em uma região Fc do anticorpo (vide, por exemplo, a Patente U.S. 6.194.551
20 e U.S. 6.242.195). Alternativa ou adicionalmente, podem ser introduzidos resíduos de cisteína na região Fc, permitindo, dessa forma, a formação de ligação dissulfeto intercadeias nessa região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter capacidade de internalização aumentada ou reduzida e/ou morte celular mediada por complemento aumentada ou reduzida. Vide
25 Caron e outros, *J. Exp Med.* 176: 1.191-1.195 (1992) e Shopes, B. *J. Immunol.* 148: 2.918-2.922 (1992), WO 99/51642, Duncan & Winter *Nature* 322: 738-40 (1988); Patentes U.S. 5.648.260, U.S. 5.624.821 e WO 94/29351.

Entende-se ainda que a função efetora pode variar de acordo com a afinidade de ligação do anticorpo. Por exemplo, anticorpos com alta
30 afinidade podem ser mais eficientes na ativação do sistema complemento comparados com anticorpos com afinidade relativamente menor (Marzocchi-Machado e outros 1999 *Immunol. Invest.* 28: 89- 101). Consequentemente,

um anticorpo pode ser alterado de tal forma que a afinidade de ligação por seu antígeno seja reduzida (por exemplo, por alteração das regiões variáveis do anticorpo por métodos como, por exemplo, substituição, adição ou eliminação de um ou mais resíduos de aminoácidos). Um anticorpo com afinidade de ligação reduzida pode exibir funções efetoras reduzidas, incluindo, por exemplo, ADCC e/ou CDC reduzida.

Os anticorpos anti-CD154 da presente invenção com função efetora reduzida incluem anticorpos com afinidade de ligação reduzida por um ou mais receptores Fc (FcRs) em relação a um anticorpo anti-CD154 parente ou não-variante. Consequentemente, anticorpos anti-CD154 com afinidade de ligação de FcR reduzida incluem anticorpos anti-CD154 que exibem uma diminuição de 1,5 vez, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes ou mais na afinidade de ligação por um ou mais receptores Fc, comparados com um anticorpo anti-CD154 parente ou não-variante (por exemplo, anticorpo 342 ou 5c8). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CD154 com função efetora reduzida se liga a um FcR com cerca de 10 vezes menos afinidade em relação a um anticorpo parente ou não-variante. Em outras modalidades, um anticorpo anti-CD154 com função efetora reduzida se liga ao FcR com cerca de 15 vezes menos afinidade ou com cerca de 20 vezes menos afinidade em relação a um anticorpo parente ou não-variante. O receptor FcR pode ser um ou mais de Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII, e isoformas dos mesmos, e Fc ϵ R, Fc μ R, Fc δ R e/ou um Fc α R. Em modalidades particulares, um anticorpo anti-CD154 com função efetora reduzida exibe uma diminuição 1,5 vez, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes, ou mais, na afinidade de ligação ao Fc γ RIIIa.

Consequentemente, em certas modalidades, um anticorpo anti-CD154 da presente invenção exibe ligação reduzida a uma proteína do complemento em relação a um segundo anticorpo anti-CD154. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CD154 da invenção exibe ligação reduzida por um fator de cerca de 1,5 vez ou mais, cerca de 2 vezes ou mais, cerca de 3 vezes ou mais, cerca de 4 vezes ou mais, cerca de 5 vezes ou mais, cerca de 6 vezes ou mais, cerca de 7 vezes ou mais, cerca de 8 vezes ou

mais, cerca de 9 vezes ou mais, cerca de 10 vezes ou mais, ou cerca de 15 vezes ou mais, em relação a um segundo anticorpo anti-CD154.

Conseqüentemente, em certas modalidades, a presente invenção está relacionada aos anticorpos que despertam função efetora reduzida quando administrados a um indivíduo. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CD154 desta invenção não causa trombose em um indivíduo que recebe a administração do anticorpo. Trombose inclui, por exemplo, acidentes tromboembólicos. Esses acidentes incluem, por exemplo, vasculopatia (por exemplo, alterações vasculares como, por exemplo, espessamento íntimo e alterações na parede do vaso). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CD154 desta invenção causa menos acidentes tromboembólicos em relação a um segundo anticorpo CD154-específico (por exemplo, anticorpo 342, anticorpo 5c8 ou 5c8 humanizado). Um anticorpo anti-CD154 com função efetora reduzida pode apresentar uma redução de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% ou 50% no número de acidentes tromboembólicos quando administrado a um indivíduo e comparado com um anticorpo anti-CD154 não-variante ou parente.

Em certas modalidades, um anticorpo anti-CD154 desta invenção não causa agregação ou ativação plaquetária *in vitro* e/ou aumenta a agregação ou ativação plaquetária em um menor grau, quando comparado com um segundo anticorpo CD154-específico (por exemplo, anticorpo 5c8 ou 5c8 humanizado; vide Exemplo 1). Conseqüentemente, em certas modalidades, a presença de uma proteína de ligação de CD154 da presente invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, em um ensaio-padrão de agregação ou ativação plaquetária não resulta na agregação ou ativação de mais do que 20%, 25%, 30% ou 50% em relação à agregação ou ativação observada em um ensaio de controle negativo. Um ensaio de agregação plaquetária padronizado exemplar é o ensaio aqui descrito (Exemplo 11, Ensaio 1) e mostrado na Figura 26. Tanto um ensaio-padrão quanto um ensaio alternativo de agregação plaquetária (Ensaio 2, Figura 27) que podem ser usados na invenção são descritos no Exemplo 11. A proteína de ligação de CD154 pode ser solúvel.

Em certas modalidades, esta invenção também fornece proteína, de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, a referida proteína compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina que se liga especificamente e de forma monovalente ao CD40L, em que a ligação da referida proteína solúvel ao CD154 não induz substancialmente fosforilação de JNK em células Jurkat T. Esta invenção também fornece proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, a referida proteína compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina que se liga especificamente e de forma monovalente ao CD154, em que a ligação da referida proteína solúvel ao CD154 não induz substancialmente secreção de IFN gama por células Jurkat T coestimuladas com anticorpo anti-CD3.

Certas modalidades da presente invenção estão relacionadas a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma ou mais sequências CDR da cadeia pesada selecionadas de DR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 5), em que o anticorpo ainda compreende uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental. Em modalidades adicionais, o anticorpo anti-CD154 compreende pelo menos duas das CDRs e, em outras modalidades, o anticorpo compreende todas as três sequências da CDR da cadeia pesada, que são CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 5).

Outras modalidades da presente invenção estão relacionadas a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma ou mais sequências da CDR da cadeia leve selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 8), o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental. Em modalidades adicionais, o anticorpo anti-CD154 compreende pelo menos duas das CDRs da cadeia leve e, em outras modalidades, o anticorpo compreende todas as três sequências da CDR da cadeia leve, que são CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 8).

Em modalidades adicionais da presente invenção, o anticorpo

anti-CD154 com função efetora reduzida compreende todas as três sequências da CDR da cadeia leve, que são CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 8), e compreende todas as três sequências da CDR da cadeia pesada, que são CDR-H1 (SEQ ID NO: 3),
5 CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 5).

Em certas modalidades, esta invenção fornece um anticorpo anti-CD154 que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que o anticorpo compreende uma sequência V_H selecionada da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11. Em certas outras modalidades,
10 esta invenção fornece um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que o anticorpo compreende uma sequência da cadeia pesada selecionada da SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13. Em modalidades adicionais, o anticorpo anti-CD154 que compreende qualquer uma ou mais das CDRs ou das sequências da cadeia pesada ou leve descritas acima é
15 um fragmento Fab ou um fragmento Fab' ou um derivado do mesmo. Ainda em modalidades adicionais, o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$ ou um derivado do mesmo. Outros fragmentos de anticorpos ou derivados dos mesmos que compreendem as CDRs ou as sequências da cadeia pesada ou leve que se ligam especificamente a uma proteína CD154 também são incluídos.
20 Esses anticorpos podem ser modificados de forma a despertar funções efetoras reduzidas ou ausência de funções efetoras. Conseqüentemente, em certas modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência V_H selecionada da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11, o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida
25 comparada com uma região Fc nativa ou parental.

Em outras modalidades, a invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência V_L selecionada da SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 14, o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental.
30

Em algumas modalidades, um anticorpo compreende uma se-

quência de cadeia leve variável da SEQ ID NO: 2. Em modalidades adicionais, um anticorpo que compreende SEQ ID NO: 2 é um fragmento Fab ou um fragmento Fab' ou um derivado do mesmo. Ainda em outras modalidades, o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$ ou um derivado do mesmo. Outros
5 fragmentos de anticorpos ou derivados dos mesmos que compreendem as CDRs ou as sequências da cadeia pesada ou leve que se ligam especificamente a uma proteína CD154 também são incluídos.

Em modalidades adicionais, a invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência V_L selecionada do
10 grupo que consiste na SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 14 e que ainda compreende uma sequência V_H selecionada da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11, o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental.

15 Em outras modalidades, a invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência V_H da SEQ ID NO: 29 e uma sequência V_L da SEQ ID NO: 30, o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental.

20 Em certas modalidades, a presente invenção fornece um anticorpo anti-CD154 que se liga especificamente a uma proteína CD154, em que o anticorpo compreende sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15. Em modalidades adicionais, o anticorpo que compreende sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 ainda compreende uma região Fc variante que
25 confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental (por exemplo, uma região Fc com glicosilação alterada e/ou outra modificação).

Em certas modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência da cadeia leve da
30 SEQ ID NO: 15 e uma sequência da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13, o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida

comparada com uma região Fc nativa ou parental (por exemplo, uma região Fc com glicosilação alterada e/ou outra modificação).

Em certas modalidades, a invenção fornece um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência da cadeia leve apresentada na SEQ ID NO: 2 ou 14 e uma sequência da cadeia pesada apresentada na SEQ ID NO: 1, 9, 10 ou 11. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD154 pode ser um fragmento de anticorpo. Em modalidades adicionais, o anticorpo é um fragmento Fab ou um fragmento Fab' ou um derivado dos mesmo. Ainda em modalidades adicionais, o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$ ou um derivado dos mesmo. Outros fragmentos de anticorpos ou derivados dos mesmos que compreendem as CDRs ou as sequências da cadeia pesada ou leve que se ligam especificamente a uma proteína CD154 também são incluídos. Adicionalmente, os anticorpos podem exibir função efetora reduzida. Por exemplo, anticorpos que compreendem uma região Fc podem compreender uma região Fc com uma ou mais modificações (por exemplo, glicosilação alterada, conjugação etc.), de tal forma que o anticorpo desperte função efetora (ou funções efetoras) reduzida ou ausente.

Em outras modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e uma sequência da cadeia pesada da SEQ ID NO: 13, em que o anticorpo ainda compreende uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental. Em outras modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e uma sequência da cadeia pesada da SEQ ID NO: 12, em que o anticorpo ainda compreende uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental.

Em algumas modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma ou mais sequências da CDR da cadeia pesada selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 44), o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida compara-

da com uma região Fc nativa ou parental. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD154 compreende pelo menos duas das CDRs da cadeia pesada e, em outras modalidades, o anticorpo compreende todas as três sequências da CDR da cadeia pesada, que são CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 44).

Em certas modalidades, a invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma ou mais sequências da CDR da cadeia leve selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 47), o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD154 compreende pelo menos duas das CDRs da cadeia leve e, em outras modalidades, o anticorpo compreende todas as três sequências da CDR da cadeia leve, que são CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 47).

Modalidades adicionais da presente invenção estão relacionadas ao anticorpo anti-CD154 que compreende uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental, em que o anticorpo compreende todas as três sequências da CDR da cadeia leve, que são CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 47), e em que o anticorpo compreende todas as três sequências da CDR da cadeia pesada, que são as CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 44).

Em outras modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma ou mais sequências da CDR da cadeia pesada selecionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50), o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental. Em modalidades adicionais, o anticorpo anti-CD154 compreende pelo menos duas das CDRs da cadeia pesada e, em outras modalidades, o anticorpo compreende todas as três sequências da CDR da cadeia pesada, que são CDR-H1 (SEQ ID NO: 48),

CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50).

Em certas modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma ou mais sequências da CDR da cadeia leve selecionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 53), o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental. Em modalidades adicionais, o anticorpo compreende pelo menos duas das CDRs da cadeia leve e, em outras modalidades, o anticorpo compreende todas as três sequências da CDR da cadeia leve, que são as CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 53).

Em certas modalidades, um anticorpo anti-CD154 com função efetora reduzida compreende todas as três sequências da CDR da cadeia leve, que são CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) e CDR-L3 (SEQ ID NO: 53), e ainda compreende todas as três sequências da CDR da cadeia pesada, que são as CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) e CDR-H3 (SEQ ID NO: 50).

Em modalidades adicionais, esta invenção fornece um anticorpo anti-CD154 que se liga especificamente ao CD154, em que o anticorpo compreende uma sequência V_L da SEQ ID NO: 54. A invenção também está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência V_H da SEQ ID NO: 56. Um anticorpo anti-CD154 da invenção pode compreender tanto uma sequência V_L da SEQ ID NO: 54 quanto uma sequência V_H da SEQ ID NO: 56. Em modalidades adicionais, o anticorpo é um fragmento Fab ou um fragmento Fab' ou um derivado dos mesmos. Ainda em modalidades adicionais, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$ ou um derivado dos mesmos. O anticorpo ou fragmento também pode ser um anticorpo humanizado ou totalmente humano ou fragmento do mesmo. Certas modalidades da presente invenção estão relacionadas a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência V_H da SEQ ID NO: 56 e uma sequência V_L da SEQ ID NO: 54, o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com

uma região Fc nativa ou parental.

Em modalidades adicionais, esta invenção fornece um anticorpo anti-CD154 que se liga especificamente ao CD154, em que o anticorpo compreende uma sequência V_L da SEQ ID NO: 58. Em modalidades adicionais, o anticorpo compreende uma sequência V_H da SEQ ID NO: 60. Em modalidades adicionais, o anticorpo ou fragmento compreende uma sequência V_H da SEQ ID NO: 60 e uma sequência V_L da SEQ ID NO: 58. O anticorpo pode ser um fragmento Fab ou um fragmento Fab' ou um derivado dos mesmo. Ainda em modalidades adicionais, o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$ ou um derivado dos mesmo. O anticorpo também pode ser um anticorpo humanizado ou totalmente humano ou fragmento do mesmo. Em outras modalidades, a presente invenção está relacionada a um anticorpo anti-CD154 que compreende uma sequência V_H da SEQ ID NO: 58 e uma sequência V_L da SEQ ID NO: 60, o anticorpo compreendendo ainda uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental.

Anticorpos anti-CD154 com glicosilação alterada

A remoção de glicano produz uma mudança estrutural que deve reduzir acentuadamente a ligação a todos os membros da família do receptor Fc através de espécies. Em anticorpos glicosilados, incluindo anticorpos anti-CD154, os glicanos (oligossacarídeos) anexados ao sítio conservado ligado ao N nos domínios CH2 do dímero de Fc estão confinados entre os domínios CH2, com os resíduos de açúcar fazendo contato com resíduos de aminoácidos específicos no domínio CH2 oposto. Diferentes padrões de glicosilação estão associados a diferentes propriedades biológicas de anticorpos (Jefferis e Lund, 1997, *Chem. Immunol.*, 65: 111-128; Wright e Morrison, 1997, *Trends Biotechnol.*, 15: 26-32). Certas glicofomas específicas conferem propriedades biológicas potencialmente vantajosas. A perda dos glicanos altera o espaçamento entre os domínios e aumenta a mobilidade entre eles, e espera-se que tenha um efeito inibidor sobre a ligação de todos os membros da família do receptor Fc. Por exemplo, estudos *in vitro* com vários anticorpos glicosilados demonstraram que a remoção dos glicanos de CH2

altera a estrutura de Fc de tal forma que a ligação do anticorpo aos receptores Fc e à proteína do complemento C1q é acentuadamente reduzida. Outra abordagem conhecida para a redução das funções efetoras é a inibição da produção ou remoção dos glicanos ligados ao N na posição 297 (numeração EU) no domínio CH2 do Fc (Nose e outros, 1983 *PNAS* 80: 6.632; Leatherbarrow e outros, 1985 *Mol. Immunol.* 22: 407; Tao e outros, 1989 *J. Immunol.* 143: 2.595; Lund e outros, 1990 *Mol. Immunol.* 27: 1.145; Dorai e outros, 1991 *Hybridoma* 10: 211; Hand e outros, 1992 *Cancer Immunol. Immunother.* 35: 165; Leader e outros, 1991 *Immunology* 72: 481; Pound e outros, 1993 *Mol. Immunol.* 30: 233; Boyd e outros, 1995 *Mol. Immunol.* 32: 1.311). Sabe-se também que diferentes glicofomas podem afetar profundamente as propriedades de uma substância terapêutica, incluindo a farmacocinética, a farmacodinâmica, a interação com receptor e direcionamento tecido-específico (Graddis e outros, 2002, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3: 285-297). Em particular, para anticorpos, a estrutura de oligossacarídeo pode afetar as propriedades relevantes para resistência à protease, a meia-vida sérica do anticorpo mediada pelo receptor FcRn, a fagocitose e retorno micro-hete do anticorpo, além de funções efetoras do anticorpo (por exemplo, ligação ao complexo do complemento C1, que induz CDC, e ligação aos receptores FcγR, que são responsáveis pela modulação da via da ADCC) (Nose e Wigzell, 1983; Leatherbarrow e Dwek, 1983; Leatherbarrow e outros, 1985; Walker e outros, 1989; Carter e outros, 1992, *PNAS*, 89: 4.285-4.289).

Consequentemente, outro meio para a modulação da função efetora de anticorpos inclui a alteração da glicosilação da região constante do anticorpo. Glicosilação alterada inclui, por exemplo, uma diminuição ou um aumento no número de resíduos glicosilados, uma mudança no padrão ou localização de resíduos glicosilados, bem como uma mudança na estrutura do açúcar (ou dos açúcares). Os oligossacarídeos encontrados em IgGs humanas afetam seu grau de função efetora (Raju, T.S. *BioProcess International*, abril de 2003, 44-53); a micro-heterogeneidade de oligossacarídeos da IgG humana pode afetar as funções biológicas como, por exemplo, CDC e ADCC, ligação a vários receptores Fc, e ligação à proteína C1q (Wright A.

e Morrison S.L. *TIBTECH* 1997, 15 26-32; Shields e outros *J. Biol. Chem.* 2001 276 (9): 6.591-604; Shields e outros *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (30): 26.733-40; Shinkawa e outros *J. Biol. Chem.* 2003 278 (5): 3.466-73; Umana e outros *Nat. Biotechnol.* Fevereiro de 1999; 17 (2): 176-80). Por exemplo, a
5 habilidade de IgG para se ligar ao C1q e ativar a cascata do complemento pode depender da presença, ausência ou modificação da porção de carboidrato posicionada entre os dois domínios CH2 (que normalmente estão ancorados em Asn297) (Ward e Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2: 77-94 (1995).

10 Os sítios de glicosilação em um polipeptídeo contendo Fc, por exemplo, um anticorpo como, por exemplo, um anticorpo IgG, podem ser identificados por técnicas padronizadas. A identificação do sítio de glicosilação pode ser experimental ou baseada em análise de sequência ou dados de modelagem. Foram descritos motivos de consenso, isto é, a sequência
15 de aminoácidos reconhecida por várias glicosil transferases. Por exemplo, o motivo de consenso para um motivo de glicosilação ligada ao N é frequentemente NXT ou NXS, em que X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina. Também foram descritos vários algoritmos para a localização de um potencial motivo de glicosilação. Consequentemente, para identificar potenciais sítios de glicosilação dentro de um anticorpo ou fragmento contendo Fc,
20 a sequência do anticorpo é examinada, por exemplo, pela utilização de bases de dados disponíveis publicamente como, por exemplo, o site da Internet fornecido pelo "Center for Biological Sequence Analysis" (vide os serviços NetNGlyc para prever sítios de glicosilação ligada ao N e os serviços NetO-
25 Glyc para prever sítios de glicosilação ligada ao O).

Estudos *in vivo* confirmaram a redução na função efetora de anticorpos não-glicosilados. Por exemplo, um anticorpo anti-CD8 não-glicosilado é incapaz de eliminar células que abrigam CD8 em camundongos (Isaacs, 1992 *J. Immunol.* 148: 3.062) e um anticorpo anti-CD3 não-glicosilado não induz a síndrome de liberação de citocina em camundongos
30 ou em seres humanos (Boyd, 1995 *supra*; Friend, 1999 *Transplantation* 68: 1.632).

Significativamente, embora a remoção dos glicanos no domínio CH2 pareça ter um efeito significativo sobre a função efetora, outras propriedades funcionais e físicas do anticorpo permanecem inalteradas. Especificamente, foi demonstrado que a remoção dos glicanos teve pouco ou nenhum efeito sobre a meia-vida sérica e a ligação ao antígeno (Nose, 1983 *supra*; Tao, 1989 *supra*; Dorai, 1991 *supra*; Hand, 1992 *supra*; Hobbs, 1992 *Mol. Immunol.* 29: 949).

Embora haja validação *in vivo* da abordagem não-glicosilada, há relatos de função efetora residual com mAbs não-glicosilados (vide, por exemplo, Pound, J. D. e outros (1993) *Mol. Immunol.* 30 (3): 233-41; Dorai, H. e outros (1991) *Hybridoma* 10 (2): 211-7). Armour e outros Mostram ligação residual às proteínas Fc γ R1a e Fc γ R1b (*Eur. J. Immunol.* (1999) 29: 2.613-1.624; *Mol. Immunol.* 40 (2003) 585-593). Dessa forma, uma diminuição adicional da função efetora, particularmente da ativação do complemento, pode ser importante para garantir a ablação completa da atividade em alguns casos. Por isso, prevê-se que formas não-glicosiladas de IgG2 e IgG4 e um híbrido de G1/G4 serão úteis nos métodos e nas composições de anticorpo da invenção que possuem funções efetoras reduzidas.

Geração de anticorpos anti-CD154 desglicosilados ou não-glicosilados

Os anticorpos anti-CD154 da presente invenção podem ser modificados ou alterados para despertar função efetora (ou funções efetoras) reduzida (comparados com um segundo anticorpo CD154-específico) retraindo, opcionalmente, os outros atributos valiosos da porção Fc.

Consequentemente, em certas modalidades, a presente invenção está relacionada aos anticorpos anti-CD154 não-glicosilados com função efetora diminuída, que são caracterizados por uma modificação no sítio conservado ligado ao N nos domínios CH2 da porção Fc do anticorpo. Uma modificação do sítio conservado ligado ao N nos domínios CH2 do dímero de Fc pode levar aos anticorpos anti-CD154 não-glicosilados. Exemplos dessas modificações incluem a mutação do sítio conservado ligado ao N nos domínios CH2 do dímero de Fc, a remoção de glicanos anexados ao sítio ligado ao N nos domínios CH2, e a prevenção da glicosilação. Por exemplo, um

anticorpo anti-CD154 não-glicosilado pode ser criado por alteração do sítio canônico ligado ao N de Asn no domínio CH2 da cadeia pesada para um resíduo de Gln (vide, por exemplo, WO 05/03175 e Patente U.S. 2006-0193856).

5 Em uma modalidade da presente invenção, a modificação compreende uma mutação no sítio de glicosilação da cadeia pesada para evitar a glicosilação no sítio. Dessa forma, em uma modalidade desta invenção, os anticorpos anti-CD154 não-glicosilados são preparados por mutação do sítio de glicosilação da cadeia pesada, isto é, mutação de N298Q (N297 usando
10 a numeração EU de Kabat), e expressos em uma célula hospedeira adequada. Por exemplo, essa mutação pode ser obtida de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante para o kit de mutagênese sítio-exclusivo de Amersham-Pharmacia Biotech® (Piscataway, NJ, EUA).

 O anticorpo mutado pode ser expresso de forma estável em
15 uma célula hospedeira (por exemplo, célula NSO ou CHO) e depois purificado. Como exemplo, a purificação pode ser realizada com o uso de cromatografia por filtração em Proteína A e gel. Ficará evidente para aqueles versados na técnica que métodos de expressão e purificação adicionais também poderão ser utilizados.

20 Em outra modalidade da presente invenção, os anticorpos anti-CD154 não-glicosilados possuem função efetora diminuída, em que a modificação no sítio conservado ligado ao N nos domínios CH2 da porção Fc do referido anticorpo ou derivado de anticorpo compreende a remoção dos glicanos do domínio CH2, isto é, desglicosilação. Esses anticorpos anti-CD154
25 não-glicosilados podem ser gerados por métodos convencionais e depois desglicosilados enzimaticamente. Métodos para a desglicosilação enzimática de anticorpos são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica (Williams, 1973; Winkelhake & Nicolson, 1976 *J. Biol Chem.* 251: 1.074-80).

 Em outra modalidade desta invenção, a desglicosilação pode
30 ser obtida por crescimento de células hospedeiras que produzem os anticorpos em meio de cultura que compreende um inibidor de glicosilação como, por exemplo, tunicamicina (Nose e Wigzell, 1983). isto é, a modificação é a

redução ou prevenção da glicosilação no sítio conservado ligado ao N nos domínios CH2 da porção Fc do referido anticorpo.

Em outras modalidades desta invenção, polipeptídeos CD154 recombinantes (ou células ou membranas celulares que contêm esses polipeptídeos) podem ser usados como antígeno para gerar um anticorpo anti-CD154 ou derivados de anticorpos, que podem então ser desglicosilados.

Em modalidades alternativas, os anticorpos anti-CD154 não-glicosilados ou anticorpos anti-CD154 com glicosilação reduzida da presente invenção podem ser produzidos pelo método descrito em Taylor e cols (WO 05/18572 e Patente U.S. 2007-0048300). Por exemplo, em uma modalidade, um anticorpo anti-CD154 não-glicosilado pode ser produzido por alteração de um primeiro resíduo de aminoácido (por exemplo, por substituição, inserção, eliminação ou por modificação química), em que o primeiro resíduo de aminoácido alterado inibe a glicosilação de um segundo resíduo por impedimento estérico ou de carga, ou ambos. Em certas modalidades, o primeiro resíduo de aminoácido é modificado por substituição de aminoácido. Em modalidades adicionais, a substituição de aminoácido é selecionada do grupo que consiste em Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Asn, Gln, Trp, Pro, Ser, Thr, Tyr, Cys, Met, Asp, Glu, Lys, Arg e His. Em outras modalidades, a substituição de aminoácido é um resíduo de aminoácido não-tradicional. O segundo resíduo de aminoácido pode estar próximo ou dentro de um motivo de glicosilação, por exemplo, um motivo de glicosilação ligada ao N que contém a sequência de aminoácidos NXT ou NXS. Em uma modalidade exemplar, o primeiro resíduo de aminoácido é o aminoácido 299 e o segundo resíduo de aminoácido é o aminoácido 297, de acordo com a numeração de Kabat. Por exemplo, a primeira substituição de aminoácido pode ser T299A, T299N, T299G, T299Y, T299C, T299H, T299E, T299D, T299K, T299R, T299G, T299I, T299L, T299M, T299F, T299P, T299W e T299V, de acordo com a numeração de Kabat. Em modalidades particulares, a substituição de aminoácido é T299C.

A função efetora também pode ser reduzida por modificação de um anticorpo da presente invenção, de tal forma que o anticorpo contenha

uma porção de bloqueio. Porções de bloqueio exemplares incluem porções de volume estérico e/ou carga suficientes, de tal forma que ocorra a glicosilação reduzida, por exemplo, por bloqueio da habilidade de uma glicosidase para glicosilar o polipeptídeo. A porção de bloqueio pode adicional ou alternativamente reduzir a função efetora, por exemplo, por inibição da habilidade da região Fc para se ligar a um receptor ou a uma proteína do complemento. Em algumas modalidades, a presente invenção está relacionada a uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, que compreende uma sequência da CDR3 da cadeia pesada selecionada das SEQ ID NOS: 5, 44 e 50, e uma região Fc variante, a região Fc variante compreendendo um primeiro resíduo de aminoácido e um sítio de N-glicosilação, o primeiro resíduo de aminoácido modificado com química da cadeia lateral para obter volume estérico aumentado ou carga eletrostática aumentada, comparado com o primeiro resíduo de aminoácido não-modificado, reduzindo, dessa forma, o nível ou, de alguma outra forma, alterando a glicosilação no sítio de N-glicosilação. Em algumas dessas modalidades, a região Fc variante confere função efetora reduzida, comparada com um controle, região Fc não-variante. Em modalidades adicionais, a cadeia lateral com volume estérico aumentado é uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido selecionado do grupo que consiste em Phe, Trp, His, Glu, Gln, Arg, Lys, Met e Tyr. Ainda em modalidades adicionais, a química da cadeia lateral com carga eletrostática aumentada é uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido selecionado do grupo que consiste em Asp, Glu, Lys, Arg e His.

Consequentemente, em uma modalidade, a glicosilação e a ligação de Fc podem ser moduladas por substituição de T299 com uma química com carga da cadeia lateral como, por exemplo, D, E, K ou R. O anticorpo resultante terá glicosilação reduzida, bem como afinidade de ligação de Fc reduzida para um receptor Fc em função de interações eletrostáticas desfavoráveis.

Em outra modalidade, um anticorpo variante T299C, que é tanto não-glicosilado quanto capaz de formar um aduto de cisteína, pode exibir

menos função efetora (por exemplo, inibição de Fc γ RI) comparado com sua
contraparte de anticorpo não-glicosilado (vide, por exemplo, WO 05/18572).
Consequentemente, a alteração de um primeiro aminoácido proximal a um
5 motivo de glicosilação pode exibir a glicosilação do anticorpo em um segun-
do resíduo de aminoácido; quando o primeiro aminoácido é um resíduo de
cisteína, o anticorpo pode exibir função efetora ainda mais reduzida. Além
disso, a inibição da glicosilação de um anticorpo do subtipo IgG4 pode ter
um efeito mais profundo sobre a ligação de Fc γ RI, comparado com os efei-
tos da não-glicosilação nos outros subtipos.

10 Em modalidades adicionais, a presente invenção está relacio-
nada aos anticorpos anti-CD154 com glicosilação alterada que exibem liga-
ção reduzida a um ou mais receptores FcR e que opcionalmente também
exibem ligação aumentada ou normal a um ou mais receptores Fc e/ou
complemento, por exemplo, anticorpos com glicosilação alterada que man-
15 têm pelo menos a mesma afinidade de ligação ou uma afinidade de ligação
similar por um ou mais receptores Fc e/ou complemento que um anticorpo
anti-CD154 nativo de controle. Por exemplo, anticorpos anti-CD154 com
Man₅GlcNAc₂N-glicano predominantemente como a estrutura de glicano
presente (por exemplo, em que a estrutura de Man₅GlcNAc₂N-glicano está
20 presente em um nível, isto é, pelo menos cerca de 5 mols por cento mais do
que a estrutura de glicano predominante seguinte da composição de Ig) po-
dem exibir função efetora alterada, comparados com uma população de an-
ticorpos anti-CD154 em que a estrutura de Man₅GlcNAc₂N-glicano não é
predominante. Anticorpos com predominantemente essa estrutura de glicano
25 exibem ligação diminuída ao Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb, ligação aumentada ao
Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb, e ligação aumentada à subunidade C1q do complexo C1
(vide a Patente U.S. 2006-0257399). Essa estrutura de glicano, quando é a
estrutura de glicano predominante, confere ADCC aumentada, CDC aumen-
tada, meia-vida sérica aumentada, produção aumentada de anticorpo por
30 células B, e fagocitose diminuída por macrófagos.

Em geral, as estruturas de glicosilação em uma glicoproteína i-
rão variar, dependendo do hospedeiro de expressão e das condições de cul-

tivo (Raju, T.S. *BioProcess International*, abril de 2003. 44-53). Tais diferenças podem levar a alterações tanto na função efetora quanto na farmacocinética (Israel e outros *Immunology*. 1996; 89 (4): 573-578; Newkirk e outros *P. Clin. Exp.* 1996; 106 (2): 259-64). Por exemplo, a galactosilação pode variar com as condições da cultura de células, que podem tornar algumas composições de imunoglobulina imunogênicas, dependendo de seu padrão de galactose específico (Patel e outros, 1992. *Biochem J.* 285: 839-845). As estruturas de oligossacarídeos de glicoproteínas produzidas por células de mamíferos não-humanos tendem a ser mais intimamente relacionadas àquelas de glicoproteínas humanas. Além disso, sistemas hospedeiros de expressão de proteína podem ser criados por engenharia genética ou selecionados para expressar uma glicofoma de Ig predominante ou, alternativamente, podem produzir naturalmente glicoproteínas que possuem estruturas de glicano predominantes. Exemplos de sistemas hospedeiros de expressão de proteína criados por engenharia genética que produzem uma glicoproteína que possui uma glicofoma predominante incluem nocautes/mutações gênicas (Shields e outros, 2002, *JBC*, 277: 26.733-26.740); engenharia genética em (*Umana e outros, 1999, Nature Biotech.*, 17: 176-180) ou uma combinação de ambos. Alternativamente, certas células expressam naturalmente uma glicofoma predominante - por exemplo, galinhas, seres humanos e vaca (Raju e outros, 2000, *Glycobiology*, 10: 477-486). Dessa forma, a expressão de um anticorpo anti-CD154 ou de uma composição de anticorpo que possui glicosilação alterada (por exemplo, predominantemente uma estrutura de glicano específica) pode ser obtida por aqueles versados na técnica por seleção de pelo menos um dos muitos sistemas hospedeiros de expressão. Sistemas hospedeiros de expressão de proteína que podem ser usados para produzir os anticorpos anti-CD154 da presente invenção incluem células animais, de plantas, de insetos, bacterianas e similares. Por exemplo, as Patentes U.S. 2007-0065909, 2007-0020725 e 2005-0170464 descrevem a produção de moléculas não-glicosiladas de imunoglobulina em células bacterianas. Como exemplo adicional, Wright e Morrison produziram anticorpos em uma linhagem de células CHO deficientes na glicosilação

(1994 *J. Exp. Med.* 180: 1087-1096), e demonstraram que anticorpos produzidos nessa linhagem de células eram incapazes de citólise mediada por complemento. Outros exemplos de sistemas hospedeiros de expressão encontrados na técnica para a produção de glicoproteínas incluem: células CHO: Raju WO 99/22764 e Presta WO 03/35835; células de hibridoma: Trebak e outros, 1999, *J. Immunol. Methods*, 230: 59-70; células de inseto: Hsu e outros, 1997, *JBC*, 272: 9.062-970; e células de planta: Gerngross e outros, WO 04/74499. Na medida em que certa célula ou extrato tenha resultado na glicosilação de certo motivo, estão disponíveis metodologias reconhecidas na técnica para determinar se o motivo foi glicosilado, por exemplo, com o uso de eletroforese em gel e/ou espectroscopia de massa.

Métodos adicionais para a alteração de sítios de glicosilação de anticorpos são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 6.50.861 e U.S. 5.714.350, WO 05/18572 e WO 05/03175; esses métodos podem ser usados para produzir os anticorpos anti-CD154 da presente invenção com glicosilação alterada, reduzida ou ausente.

Os anticorpos anti-CD154 não-glicosilados com função efetora reduzida podem ser anticorpos que compreendem modificações ou podem ser conjugados para compreender uma porção funcional. Essas porções incluem uma porção de bloqueio (por exemplo, uma porção de PEG, adutos de cisteína etc.), uma porção detectável (por exemplo, porções fluorescentes, porções radioisotópicas, porções radiopacas etc., incluindo porções diagnósticas) e/ou uma porção terapêutica (por exemplo, agentes citotóxicos, agentes anti-inflamatórios, agentes imunomoduladores, agentes anti-infecciosos, agentes anticâncer, agentes antineurodegenerativos, radionuclídeos etc.).

Conjugados de anticorpo

Quando administrados, os anticorpos são frequentemente depurados rapidamente da circulação e podem, portanto, despertar atividade farmacológica relativamente curta. Consequentemente, podem ser necessárias injeções frequentes de doses relativamente grandes de anticorpos para sustentar a eficácia terapêutica do tratamento com anticorpo.

Em uma modalidade desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção podem ser anticorpos modificados (por exemplo, anexados a outras porções como, por exemplo, uma porção funcional heteróloga) para aumentar a integridade e a longevidade do anticorpo *in vivo*. Por exemplo, os anticorpos anti-CD154 desta invenção podem ser anticorpos que são modificados para incluir uma porção (porção funcional) que possa aumentar a estabilização, prolongando, dessa forma, a meia-vida sérica do anticorpo. A meia-vida sérica de uma proteína de ligação de CD154 da invenção, por exemplo, um anticorpo, pode ser de pelo menos 3 dias, pelo menos 7 dias, pelo menos 14 dias, pelo menos 21 dias, pelo menos 28 dias, pelo menos 1 mês, ou mais. Essas porções funcionais que aumentam a meia-vida dos anticorpos podem ser particularmente úteis em modalidades em que o anticorpo é um fragmento de anticorpo, por exemplo.

Modificações de anticorpos também podem aumentar a solubilidade da proteína em solução aquosa, eliminar a agregação, aumentar a estabilidade física e química da proteína, e reduzir acentuadamente a imunogenicidade e antigenicidade da proteína. Como resultado, a atividade biológica *in vivo* desejada pode ser obtida pela administração desses adutos de polímero-proteína menos frequentemente ou em doses menores do que com a proteína não-modificada.

Consequentemente, em certas modalidades, os anticorpos da invenção são anticorpos anexados a porções funcionais heterólogas para formar conjugados de anticorpo. Uma "porção funcional" refere-se a qualquer porção funcional (por exemplo, polipeptídeo, domínio de proteína, veículo, polímero etc.) que esteja associada a um anticorpo da invenção. A associação com um anticorpo anti-CD154 pode ser por adesão covalente ou não-covalente, e também pode ser reversível ou irreversível. Moléculas exemplares que podem ser usadas para formar conjugados de anticorpo de CD154 da presente invenção incluem, sem limitação, porções funcionais como, por exemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biologicamente ativas, por exemplo, enzimas, outros anticorpos, derivados de anticorpos ou fragmentos de anticorpos, polímeros sintéticos (por exem-

plo, PEG) ou de ocorrência natural, ácidos nucleicos e fragmentos dos mesmos, por exemplo, DNA, RNA e fragmentos do mesmo, aptâmeros, radionuclídeos, particularmente radioiodeto, radioisótopos, metais quelados, nanopartículas e grupos repórteres, tais como compostos fluorescentes ou luminescentes ou compostos que podem ser detectados por técnicas de imagem como, por exemplo, ressonância nuclear magnética (RNM) ou espectroscopia ESR.

Em um exemplo adicional, uma porção funcional à qual os anticorpos da invenção são conjugados pode aumentar a meia-vida do anticorpo *in vivo* e/ou reduzir a imunogenicidade do anticorpo e/ou aumentar a liberação de um anticorpo através de uma barreira epitelial ao sistema imunológico. Exemplos de porções funcionais desse tipo adequadas incluem polímeros, dextrana, hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), transferrina, albumina, proteínas de ligação de albumina ou compostos de ligação de albumina, tais como aqueles descritos em PCT/GB2005/002084.

Quando a porção funcional é um polímero, ele pode, em geral, ser um polímero sintético ou um polímero de ocorrência natural, por exemplo, um polímero de cadeia linear ou ramificada opcionalmente substituído de polialquileno, polialquenileno ou polioxialquileno, ou um polissacarídeo ramificado ou não-ramificado, por exemplo, um homo- ou hetero- polissacarídeo. Vide, por exemplo, Veronese e Pasut, 2005, "Drug Discovery Today", 10 (21): 1.451-1.458; Pasut e outros, 2004, *Expert Opinion in Therapeutic Patents*, 14 (6): 859-894.

Substituintes opcionais particulares que podem estar presentes nos polímeros sintéticos mencionados acima incluem um ou mais grupos hidróxi, metil ou metóxi.

Exemplos específicos de polímeros sintéticos incluem poli(etilenoglicol), poli(propilenoglicol), poli(álcool vinílico) de cadeia linear ou ramificada opcionalmente substituídos, ou derivados dos mesmos, especialmente poli(etilenoglicol) opcionalmente substituído como, por exemplo, metoxipoli(etilenoglicol) ou derivados do mesmo.

Polímeros de ocorrência natural específicos incluem lactose,

amilose, dextrana, glicogênio ou derivados dos mesmos. "Derivados", neste contexto, visa incluir derivados reativos, por exemplo, grupos reativos seletivos para tiol como, por exemplo, maleimidias e similares. O grupo reativo pode estar ligado diretamente ou por meio de um segmento vinculador ao polímero. Será observado que o resíduo de um grupo desse tipo, em alguns casos, formará parte do produto como o grupo de ligação entre o fragmento de anticorpo e o polímero.

O tamanho do polímero pode variar da forma desejada, mas geralmente estará em uma faixa de peso molecular médio de 500 Da a 50.000 Da, de preferência de 5.000 Da a 40.000 Da e, mais preferivelmente, de 20.000 Da a 40.000 Da. O tamanho do polímero pode, em particular, ser selecionado com base no uso desejado do produto, por exemplo, habilidade para se localizar em certos tecidos como, por exemplo, tumores, ou meia-vida circulante prolongada (para uma revisão, vide Chapman, 2002, "Advanced Drug Delivery Reviews", 54, 531-545). Dessa forma, por exemplo, quando o produto se destinar a deixar a circulação e penetrar em um tecido, por exemplo, para uso no tratamento de um tumor, pode ser vantajoso usar um polímero de pequeno peso molecular, por exemplo, com um peso molecular em torno de 5.000 Da. Para aplicações nas quais o produto permanece na circulação, pode ser vantajoso usar um polímero com peso molecular maior, por exemplo, que possua um peso molecular na faixa de 20.000 Da a 40.000 Da.

Polímeros particularmente preferidos incluem um polímero de polialquileno como, por exemplo, um poli(etilenoglicol) ou, especialmente, um metoxipoli(etilenoglicol) ou um derivado dos mesmo, e especialmente com um peso molecular na faixa de cerca de 15.000 Da a cerca de 40.000 Da.

De preferência, o anticorpo, derivado de anticorpo ou fragmento de anticorpo desta invenção, incluindo um anticorpo ou fragmento com função efetora reduzida, é anexado a um polímero de polialquileno, particularmente um poli(etilenoglicol) (aqui abreviado para PEG) ou um derivado dos mesmo. Em certas modalidades, o anticorpo, derivado de anticorpo ou frag-

mento de anticorpo desta invenção é um fragmento de anticorpo, isto é, um fragmento Fab' ou F(ab')₂ ou um derivado dos mesmo, que é anexado ao PEG tanto na cadeia pesada quanto na cadeia leve, ou em ambas. Esse fragmento Fab' ou F(ab')₂ do mesmo pode ser humano ou humanizado.

5 Consequentemente, em certas modalidades desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção são anticorpos que são modificados por adesão covalente de porções funcionais como, por exemplo, polímeros hidrossolúveis, tais como poli(etilenoglicol), copolímeros de poli(etilenoglicol) e poli(propilenoglicol), carboximetil celulose, dextrana, poli(álcool vinílico),
10 poli(vinilpirrolidona) ou poli(prolina) – todos conhecidos por exibirem meias-vidas substancialmente mais longas no sangue após injeção intravenosa do que as proteínas não-modificadas correspondentes. Vide, por exemplo, Abuchowski e outros 1981. Em: "Enzymes as Drugs", Holcenberg e outros (ed.) 1981. Wiley-Interscience, Nova York, NY, 367-383 (1981); Anderson, W.F. 1992. "Human Gene Therapy". *Science* 256: 808-813; Newmark e outros
15 1982. *J. Appl. Biochem.* 4: 185-189; Katre e outros 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 1.487-1.491.

Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção são anticorpos anexados a porções funcionais como, por exemplo, a porções de poli(etilenoglicol) (PEG). Em uma modalidade particular, o anticorpo é um fragmento de anticorpo e as moléculas de PEG podem ser anexadas por meio de qualquer cadeia lateral de aminoácido disponível ou grupo funcional terminal de aminoácido localizado no fragmento de anticorpo, por exemplo, qualquer grupo amino, imino, tiol, hidroxil ou carboxil livre. Esses
25 aminoácidos podem ocorrer naturalmente no fragmento de anticorpo ou podem ser criados geneticamente no fragmento com o uso de métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, as Patentes U.S. 5.219.996. U.S. 5.667.425; WO 98/25971). Em outras modalidades, um fragmento Fab desta invenção é modificado pela adição à extremidade do terminal N de sua
30 cadeia pesada de um ou mais aminoácidos para permitir a adesão de uma porção funcional. De preferência, os aminoácidos adicionais formam uma região de dobradiça modificada que contém um ou mais resíduos de cisteína

aos quais a porção funcional pode ser anexada. Vários sítios podem ser usados para anexar duas ou mais moléculas de PEG.

Em certos aspectos desta invenção, as moléculas de PEG são ligadas covalentemente por meio de um grupo tiol de pelo menos um resíduo de cisteína localizado em um fragmento de anticorpo desta invenção. Cada molécula de PEG anexada ao fragmento de anticorpo modificado pode ser ligada covalentemente ao átomo de enxofre de um resíduo de cisteína localizado no fragmento. A ligação covalente geralmente será uma ligação dissulfeto ou, em particular, uma ligação enxofre-carbono. Quando um grupo tiol é usado como o ponto de adesão, podem ser usadas porções funcionais adequadamente ativadas, por exemplo, derivados seletivos de tiol como, por exemplo, maleimidas e derivados de cisteína. Um PEG ativado pode ser usado como o material de partida na preparação de fragmentos de anticorpos modificados por PEG, como descrito acima. O PEG ativado pode ser qualquer PEG que contenha um grupo tiol reativo como, por exemplo, um ácido ou éster α -halocarboxílico, por exemplo, iodoacetamida, uma imida, por exemplo, maleimida, uma vinil sulfona ou um dissulfeto. Em certas modalidades, um conjugado de anticorpo anti-CD154 pode compreender duas moléculas de PEG com duas moléculas de maleimida. Materiais de partida podem ser obtidos comercialmente (por exemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EUA) ou podem ser preparados a partir de materiais de partida disponíveis comercialmente, com a utilização de procedimentos químicos convencionais. Moléculas de PEG específicas incluem metóxi-PEG-amina de 20 kD (que pode ser obtida de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; e SunBio) e M-PEG-SPA (que pode ser obtido de Nektar, anteriormente Shearwater).

Em uma modalidade preferida, um anticorpo da invenção é um fragmento Fab modificado que é PEGuilado, isto é possui a ele anexado de forma covalente PEG (poli(etilenoglicol)), por exemplo, de acordo com o método descrito em EP 0948544 (vide também "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nova York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Appli-

cations", 1997, J. Milton Harris e S. Zalipsky (eds), "American Chemical Society", Washington DC e "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam e A. Dent, Grove Publishers, Nova York; Chapman, A. 2002, "Advanced Drug Delivery Reviews" 2002, 54: 531-545). Em um exemplo, PEG é anexado a uma cisteína na região de dobradiça. Em outro exemplo, um fragmento Fab modificado por PEG possui um grupo maleimida ligado covalentemente a um único grupo tiol em uma região de dobradiça modificada. Um resíduo de lisina pode ser ligado covalentemente ao grupo maleimida e cada um dos grupos amina no resíduo de lisina pode ser anexado a um polímero de metoxipoli(etilenoglicol) que possui um peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. O peso molecular total do PEG anexado ao fragmento Fab pode ser, portanto, de aproximadamente 40.000 Da.

Em outra modalidade, a porção funcional é PEG e é anexada com o uso dos métodos descritos em WO 98/25971 e WO 04/72116, pelos quais um grupo lisil-maleimida é anexado ao resíduo de cisteína na extremidade do terminal N da cadeia pesada, e cada grupo amino do resíduo de lisila possui ligado covalentemente a ele um resíduo de metoxipoli (etilenoglicol) que possui um peso molecular de cerca de 20.000 Da. O peso molecular total do PEG anexado ao anticorpo é, portanto, de aproximadamente 40.000 Da.

Em outra modalidade, a porção funcional é PEG e está anexada a um fragmento F(ab)₂ com uso dos métodos descritos em WO 98/25971 e WO 04/072116, pelos quais um grupo lisil-dimaleimida é anexado ao resíduo de cisteína na extremidade do terminal C de cada cadeia pesada do Fab, e cada grupo amino do resíduo de lisil possui ligado covalentemente a ele um resíduo de metoxipoli(etilenoglicol) que possui um peso molecular de cerca de 20.000 Da. O peso molecular total do PEG anexado ao anticorpo de F(ab)₂ é, portanto, de aproximadamente 40.000 Da.

Em certas modalidades desta invenção, o anticorpo desta invenção é um fragmento de anticorpo Fab', que pode ser totalmente humano ou humanizado, e é PEGuilado na cadeia pesada, na cadeia leve ou em

ambas. Em outras modalidades, o fragmento de anticorpo, que pode ser totalmente humano ou humanizado, é PEGuilado em uma ou em ambas as cadeias pesadas, ou em uma ou em ambas as cadeias leves, ou tanto nas cadeias pesadas quanto nas leves.

5 Consequentemente, em certas modalidades, um anticorpo anti-CD154 é um anticorpo ligado ao PEG (por exemplo, um anticorpo humano ligado ao PEG), em que o PEG está ligado ao anticorpo em um resíduo de cisteína ou em um resíduo de lisina. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD154 PEGuilado possui um tamanho hidrodinâmico de pelo menos 24
10 kD. Em outras modalidades, o tamanho do PEG pode variar em um intervalo entre 20 a 60 kD (inclusive). Em modalidades adicionais, o anticorpo anti-CD154 ligado ao PEG possui um tamanho hidrodinâmico de pelo menos 200 kD. Em modalidades da presente invenção nas quais o anticorpo anti-CD154 está ligado a uma porção de PEG, o anticorpo anti-CD154 PEGuilado pode
15 ter uma meia-vida *in vivo* aumentada em relação a um anticorpo anti-CD154 que não possui a porção de PEG.

 Em certas modalidades, esta invenção fornece uma proteína de ligação de CD154 que compreende uma sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e uma sequência da cadeia pesada da SEQ ID NO: 13, em que a
20 proteína é PEGuilada.

 Outras porções funcionais que podem ser úteis no aumento da integridade e longevidade dos anticorpos da presente invenção *in vivo* incluem polipeptídeos. Por exemplo, os anticorpos anti-CD154 ou fragmentos de anticorpos desta invenção podem ser modificados para incluir um polipeptídeo de albumina sérica humana (HSA). Um conjugado de anticorpo desse
25 tipo pode exibir estabilização aumentada e meia-vida sérica aumentada, comparado com um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno não-conjugado. Por exemplo, em certas modalidades, um anticorpo anti-CD154 conjugado à HSA pode exibir meia-vida aumentada *in vivo* em relação a um
30 anticorpo anti-CD154 não-conjugado. A meia-vida (meia-vida t_{α} ou t_{β}) do anticorpo conjugado à HSA pode ser aumentada por 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, ou mais. A meia-vida t_{α} pode estar na faixa de 0,25 minuto a 12 horas,

por exemplo, enquanto a meia-vida t_{β} pode estar dentro de 12-48 horas, por exemplo. A meia-vida t_{α} ou t_{β} pode preferivelmente ser de pelo menos 3 dias, pelo menos 7 dias, pelo menos 14 dias, pelo menos 21 dias, pelo menos 28 dias, pelo menos 1 mês, ou mais.

5 Em algumas modalidades desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção são anticorpos modificados com uma porção funcional por marcação com um marcador detectável, por exemplo, um isótopo radioativo, enzima, corante ou biotina, ou outro reagente de afinidade.

10 Em algumas modalidades desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção são anticorpos modificados com uma porção funcional ao serem conjugados a um agente terapêutico, por exemplo, um radioisótopo ou radionuclídeo (por exemplo, ^{111}In ou ^{90}Y), porção de toxina (por exemplo, toxoide tetânico ou ricina), toxoide ou agente quimioterápico (Patente U.S. 6.307.026).

15 Em algumas modalidades desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção são anticorpos modificados ao serem conjugados a um agente de formação de imagem. Agentes de formação de imagem podem incluir, por exemplo, uma porção marcadora (por exemplo, biotina, porções fluorescentes, porções radioativas, uma etiqueta de histidina ou de myc
20 ou outras etiquetas peptídicas) para facilitar o isolamento ou a detecção.

 Exemplos adicionais de porções funcionais para modificação ou conjugação aos anticorpos anti-CD514 da invenção podem incluir sorotoxinas ou agentes citotóxicos, incluindo qualquer agente que seja prejudicial (por exemplo, que mate) às células. Exemplos incluem combrestatinas,
25 do-lastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, di-hidróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona,
30 glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina, e análogos ou homólogos dos mesmos.

 Porções funcionais úteis em conjugação incluem, sem limitação,

antifolatos (por exemplo, aminopterina e metotrexato), antimetabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas ou duocarmicinas, CC-1065, enodiienos, neocarzinostatina), e agentes antimetabólicos (por exemplo, vincristina e vinblastina). Vide Garnett, 2001, *Advanced Drug Delivery Reviews* 53: 171-216 para mais detalhes.

Outras porções funcionais podem incluir radionuclídeos quelados, tais como ^{131}I e ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Califórnio 252 , Iridio 192 e Tungstênio 188 /Rênio 188 , 211 astatina; ou fármacos como, por exemplo, sem limitação, alquilfosfocolinas, inibidores da topoisomerase I, taxoides e suramina.

Porções funcionais adicionais incluem proteínas, peptídeos e enzimas. Enzimas de interesse incluem, sem limitação, enzimas proteolíticas, hidrolases, liases, isomerases, transferases. Proteínas, polipeptídeos e peptídeos de interesse incluem, sem limitação, imunoglobulinas, toxinas como, por exemplo, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas ou toxina diftérica, um maitansinoide (por exemplo, sem limitação, DMI), uma proteína como, por exemplo, insulina, fator de necrose tumoral, interferon α , interferon β , fator de crescimento nervoso, fator de crescimento derivado de plaquetas ou ativador de plasminogênio tecidual, um agente trombótico ou um agente antiangiogênico, por exemplo, angiostatina ou endostatina, angiogenina, gelonina, dolastatinas, ligantes de via menores, bis-ido-fenol mostarda, ou um modificador da resposta biológica como, por exemplo, uma linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), fator de estimulação de colônias de granulócitos - macrófagos (GM-CSF), fator de estimulação de colônias granulócitos (G-CSF), fator de crescimento nervoso (NGF) ou outro fator de crescimento.

Outras porções funcionais podem incluir substâncias detectáveis úteis, por exemplo, em aplicações diagnósticas. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, núclídeos radioativos, metais emissores de pósitrons (para uso em tomografia por emissão de pósitrons), e íons metálicos não-radioativos paramagnéticos. Vide, de forma geral, a Patente U.S. 4.741.900 para íons metálicos que podem ser conjugados aos anticorpos para uso como substâncias diagnósticas. Enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, ou acetilcolinesterase; grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina, avidina e biotina; materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila e ficoeritrina; materiais luminescentes adequados incluem luminol; materiais bioluminescentes adequados incluem luciferase, luciferina e aquorina; e núclídeos radioativos adequados incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In e ^{99}Tc .

Ácidos nucleicos

Em certos aspectos, a presente invenção está relacionada aos ácidos nucleicos que codificam proteínas de ligação de CD154 da presente invenção, por exemplo, anticorpos anti-CD154.

Consequentemente, em certas modalidades a presente invenção está relacionada a uma molécula de DNA isolada, recombinante e/ou sintética que compreende uma ou mais sequências selecionadas do grupo que consiste na SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 70 e SEQ ID NO: 73.

Em outro aspecto, a descrição apresenta um ácido nucleico isolado que compreende uma ou mais sequências que codificam um polipeptídeo que inclui uma sequência pelo menos 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98,

99, ou 100% idêntica à sequência de uma sequência do domínio variável da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58 ou SEQ ID NO: 60, ou uma sequência que hibridiza (por exemplo, sob condições estridentes) para um ácido nucleico que codifica a sequência de um domínio variável da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: SEQ ID NO: 56 ou SEQ ID NO: 60.

Os ácidos nucleicos da invenção podem ainda incluir sequências reguladoras (por exemplo, uma sequência de promotor, uma região 5' não-traduzida e uma região 3' não-traduzida) e/ou sequências de vetor. Por exemplo, o ácido nucleico constitui um vetor. Ainda em modalidades adicionais, a invenção está relacionada a uma célula hospedeira que compreende o vetor. A célula hospedeira pode produzir o anticorpo de tal forma que o anticorpo exiba glicosilação reduzida ou ausência de glicosilação (por exemplo, se uma região Fc estiver presente).

A presente invenção também está relacionada às variantes de sequência dos ácidos nucleicos descritos acima. Por exemplo, a presente invenção inclui sequências de ácidos nucleicos que são cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, 99,5%, 99,9% ou 100% idênticas a qualquer uma das sequências aqui fornecidas, incluindo fragmentos das mesmas e complementos das mesmas. A presente invenção também inclui ácidos nucleicos que variam das sequências especificamente aqui fornecidas em função da degeneração do código genético.

Além disso, a presente invenção inclui sequências que hibridizam especificamente para qualquer um dos ácidos nucleicos aqui fornecidos. O termo "hibridiza especificamente" refere-se à habilidade de uma sequência de ácidos nucleicos para hibridizar para pelo menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou 100 nucleotídeos consecutivos de uma sequência aqui fornecida, ou de uma sequência complementar a ela, de tal forma que tenha

menos de 15%, de preferência menos de 10% e, mais preferivelmente, menos de 5% da hibridização de fundo para um ácido nucleico de controle (por exemplo, um DNA inespecífico ou DNA diferente da sequência do anticorpo específico aqui fornecida). Várias condições de hibridização podem ser usadas para detectar hibridização específica, e a estringência é determinada primariamente pelo estágio de lavagem do ensaio de hibridização. Geralmente, temperaturas elevadas e baixas concentrações de sal geram alta estringência, enquanto temperaturas baixas e altas concentrações de sal geram estringência baixa. A hibridização com estringência baixa é obtida por lavagem em, por exemplo, cerca de 2,0 x SSC a 50°C, e a estringência alta é obtida com cerca de 0,2 x SSC a 50°C.

Os ácidos nucleicos que codificam as proteínas de ligação de CD154 da presente invenção podem compreender sequências líderes ou sinalizadoras. A sequência líder ou sinalizadora pode variar e pode ser substituída com uma sequência líder alternativa, e entende-se que, em certas modalidades, as proteínas de ligação de CD154 da presente invenção compreendem sequências sem uma sequência líder. Quaisquer sequências líderes ou sinalizadoras adequadas alternativas podem ser usadas.

Células hospedeiras

A presente invenção está relacionada às células hospedeiras produzidas por engenharia genética para expressar qualquer uma das moléculas de DNA fornecidas nas Figuras 2 a 8, 10, 11 e 13 a 16, incluindo variantes de sequência das mesmas.

Também são fornecidas células hospedeiras que expressam as proteínas de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, os anticorpos anti-CD154. Seja uma proteína de ligação ou um anticorpo, ele pode compreender apenas uma cadeia, quando, então, somente a sequência de DNA que codifica aquela cadeia polipeptídica precisa ser usada para transfectar as células. Para a produção de anticorpos que compreendem duas cadeias, a linhagem de células pode ser transfectada com dois vetores. Alternativamente, quando adequado, um único vetor pode codificar as sequências de ambas as cadeias, por exemplo, a cadeia leve e pesada de um anticorpo

anti-CD154, e variações que dependem da estrutura de anticorpo particular a ser expressa. A célula hospedeira pode ser, por exemplo, células procarióticas como, por exemplo, *E. coli*, ou outras células microbianas, ou células eucarióticas, incluindo, sem limitação, células de mamíferos como, por exemplo, células humanas, de camundongo, de macaco, de coelho, de cabra, de hamster ou de rato, células de inseto, células de aves, células de plantas e células eucarióticas inferiores, tais como células fúngicas (vide abaixo). Entende-se que o maquinário da célula hospedeira é responsável por glicosilar proteínas expressas de forma recombinante e, dessa forma, podem ser selecionados padrões de glicosilação particulares para alterar ainda mais a função efetora dos anticorpos da invenção.

Em algumas modalidades desta invenção, as células hospedeiras úteis para a prática da invenção podem ser, por exemplo, (1) células bacterianas como, por exemplo, células de *E. coli*, *Caulobacter crescentus*, *Streptococci*, *Staphylococci*, espécies de *Streptomyces* e *Bacillus subtilis*, e *Salmonella typhimurium*; (2) células fúngicas e células de *Aspergillus*, células de leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, outras espécies de *Pichia*, *K. lactis*; (3) linhagens de células de insetos, tais como aquelas de *Spodoptera frugiperda* - por exemplo, linhagens de células Sf9 e Sf21, e células expressSFTM (Protein Sciences Corp., Meriden, CT, EUA) - células S2 de *Drosophila*, e Células de High Five® *Trichoplusia ni* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); (4) células de mamíferos; ou (5) células de plantas.

Consequentemente, as proteínas de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, os anticorpos anti-CD154, podem ser produzidas em quaisquer células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas disponíveis capazes de serem produzidas geneticamente para expressar sequências de ácidos nucleicos exógenos. Células hospedeiras eucarióticas inferiores que podem ser usadas para produzir os anticorpos anti-CD154 da presente invenção incluem aquelas células descritas na técnica (vide, por exemplo, WO 02/00879, WO 03/056914, WO 04/074498, WO 04/074499, Choi e outros, 2003, *PNAS*, 100: 5022-5027; Hamilton e outros, 2003, *Nature*, 301: 1.244-

1.246 e Bobrowicz e outros, 2004, *Glycobiology*, 14: 757-766).

Células de mamíferos típicas incluem células COS1 e COS7, células de ovário de hamster chinês (CHO), células de mieloma NSO, células NIH 3T3, células 293, células HEPG2, células HeLa, C127, 3T3, BHK, 5 células de melanoma de Bowes, células L, MDCK, HEK293, WI38, linhagens de células murinos ES (por exemplo, das cepas 129/SV, C571BL6, DBA-1, 129/SVJ), K562, células Jurkat e BW5147. Dessa forma, a invenção fornece células que expressam os anticorpos da presente invenção, incluindo, sem limitação, células de hibridoma, células B, células plasmáticas, bem como 10 células hospedeiras de mamíferos e de humanas modificadas de forma recombinante para expressar os anticorpos da presente invenção (por exemplo, células-tronco embrionárias adultas). Outras linhagens de células de mamíferos úteis são bem-conhecidas e prontamente disponíveis pela "American Type Culture Collection" ("ATCC") (Manassas, VA, EUA) e pelo "National Institute of General Medical Sciences" (NIGMS) "Human Genetic Cell Repository" no "Coriell Cell Repositories" (Camden, NJ, EUA). Esses tipos 15 de célula são apenas representativos, e essa lista não tem a intenção de ser uma lista abrangente.

Entre outras considerações, algumas das quais foram descritas 20 acima, uma célula hospedeira pode ser escolhida por sua habilidade para processar o anticorpo anti-CD154 expresso na forma desejada. Além da glicosilação modificada e da não-glicosilação, essas modificações pós-tradução do polipeptídeo incluem, sem limitação, acetilação, carboxilação, carboximetilação, fosforilação, lipidação e acilação.

25 Em outra modalidade desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção são preparados por tradução sem o uso de células ou sintetizados *in vitro*. Os genes que codificam essas proteínas podem ser sintetizados *in vitro*.

Em outra modalidade, os anticorpos anti-CD154 desta invenção 30 são produzidos em biorreatores que contêm as células que expressam anticorpo, a fim de facilitar a produção em larga escala.

Em outra modalidade, as proteínas de ligação de CD154 ou os

anticorpos anti-CD154 desta invenção são produzidos em mamíferos criados por engenharia genética ou transgênicos (por exemplo, cabras, vacas, carneiros) que expressam o anticorpo no leite, a fim de facilitar a produção em larga escala dos anticorpos anti-CD154 (Patente U.S. 5.827.690; Pollock e outros 1999. *J. Immunol. Meth.* 231 (1-2): 147-57).

Métodos terapêuticos

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir uma resposta imunológica em um indivíduo. O anticorpo desta invenção, ou a composição farmacêutica da invenção, é administrado ao indivíduo em uma quantidade inibidora eficaz.

Em certas modalidades, uma "quantidade inibidora eficaz" de um anticorpo anti-CD154, ou de uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é qualquer quantidade que seja eficaz para inibir a interação CD154-CD40 no indivíduo que recebe essa administração. Métodos para a determinação de uma "quantidade inibidora" são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica e dependem de fatores que incluem, sem limitação: o tipo de indivíduo envolvido, o tamanho e a idade do indivíduo, e as propriedades farmacocinéticas do agente terapêutico liberado em particular.

Em outra modalidade específica desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir a resposta imunológica por inibição da interação CD154-CD40.

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir inflamação. Para os objetivos desta invenção, respostas inflamatórias são caracterizadas por vermelhidão, edema, calor e dor, como consequências da dilatação capilar com edema e migração de leucócitos fagocíticos. Alguns exemplos de respostas inflamatórias incluem: artrite, dermatite de contato,

síndrome hiper-IgE, doença inflamatória do intestino, asma alérgica, e doença inflamatória idiopática. Doença inflamatória idiopática inclui, por exemplo, psoríase e lúpus (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), lúpus eritematoso induzido por fármacos, e nefrite lúpica). Vide, por exemplo, Gallin
5 1989. "Fundamental Immunology", Capítulo 26, Raven Press, 2ª Edição, páginas 721-733, Nova York. Esta invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de um sintoma de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) em um indivíduo, o método compreendendo a administração de uma proteína de ligação de CD154 monovalente, por exemplo, um anticorpo monovalente
10 anti-CD154, a um indivíduo em uma quantidade eficaz para tratar ou evitar um sintoma de LES.

Alguns exemplos de artrite incluem: artrite reumatoide, artrite inflamatória não reumatoide, artrite associada à doença de Lyme e osteoartrite inflamatória. Alguns exemplos de doença inflamatória idiopática incluem:
15 psoríase e lúpus sistêmico.

Em uma modalidade desta invenção, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir a rejeição pelo indivíduo de um órgão transplantado.

Em uma modalidade mais específica desta invenção, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154 desta invenção, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir rejeição pelo indivíduo de um coração, rim, fígado, pele, células ilhota pancreática ou medula óssea transplantados.
20

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir doença enxerto versus hospedeiro em um indivíduo.
25

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir respostas alérgicas em um indivíduo - por exemplo, febre do feno ou uma alergia à penicilina ou a outros fármacos.
30

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir a resposta autoimune em um indivíduo que sofre de uma doença autoimune.

5 Em algumas modalidades, a resposta autoimune está associada ou é derivada de uma condição selecionada do grupo que consiste em: artrite reumatoide, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Graves, púrpura trombocitopênica idiopática, anemia hemolítica, diabetes melito, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, esclerose múltipla, psoríase, doenças autoimunes induzidas por fármacos, ou lúpus induzido por fármacos.
10 Em certas modalidades, a resposta autoimune está associada ou é derivada de lúpus eritematoso sistêmico.

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma
15 composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir uma resposta autoimune em um indivíduo que sofre de uma resposta autoimune que é derivada de uma doença infecciosa.

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma
20 composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir uma resposta autoimune em um indivíduo que sofre de uma resposta autoimune que é derivada de síndrome de Reiter, espondiloartrite, doença de Lyme, infecção por HIV, sífilis ou tuberculose.

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação
25 de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir fibrose em um indivíduo.

Alguns exemplos de fibrose incluem: fibrose pulmonar ou doença fibrótica. Alguns exemplos de fibrose pulmonar incluem: fibrose pulmonar
30 secundária à síndrome de sofrimento respiratório do adulto, fibrose pulmonar induzida por fármacos, fibrose pulmonar idiopática, ou pneumonite por hipersensibilização. Alguns exemplos de doenças fibróticas incluem: Hepatite C;

Hepatite B; cirrose; cirrose do fígado secundária a agressão tóxica; cirrose do fígado secundária a fármacos; cirrose do fígado secundária a uma infecção viral; e cirrose do fígado secundária a uma doença autoimune.

5 Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir uma doença gastrointestinal. Alguns exemplos de doença gastrointestinal incluem: alteração da motilidade esofágica, doença inflamatória do intestino (incluindo doença de Crohn e colite ulcerativa), gastrite, colite colagenosa
10 (incluindo colite linfocítica e colite microscópica), doença celíaca (também denominada enteropatia por glúten, espru celíaco ou intolerância ao glúten) e esclerodermia.

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma
15 composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir uma doença vascular. Alguns exemplos de doença vascular incluem: aterosclerose, doença da artéria renal, linfedema, distúrbios isquêmicos e lesão por reperfusão. Também estão incluídas doenças vasculares do colágeno/por complexo imune como, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico ou
20 crioglobulinemia.

Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma
composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir a
proliferação de um tumor de células T em um indivíduo que sofre de um
25 câncer de células T, por exemplo, um leucemia ou linfoma de células T. Um anticorpo anti-CD154 desse tipo, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, pode ser administrado ao indivíduo em uma quantidade eficaz para inibir a proliferação de células de um tumor de células T naquele indivíduo.

30 Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de inibir in-

fecção viral das células T de um indivíduo pelo vírus linfotrópico humano de célula T do tipo 1 (HTLV 1). Um anticorpo anti-CD154 desse tipo ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo pode ser administrado ao indivíduo em uma quantidade eficaz para inibir a infecção viral.

5 Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação de CD154 desta invenção, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de criar imagens de células tumorais ou células neoplásicas em um indivíduo que expressam uma proteína CD154 à qual o anticorpo desta invenção se liga
10 especificamente. Um método para a criação de imagens de células tumorais ou de células neoplásicas em um indivíduo compreende as etapas de: administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD154 desta invenção, ou de uma composição que o compreende, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo e uma proteína
15 na superfície de células tumorais ou células neoplásicas; e a geração de imagens de qualquer complexo de anticorpo/proteína formado criando imagens, dessa forma, de quaisquer células tumorais ou células neoplásicas no indivíduo.

 Em uma modalidade desta invenção, uma proteína de ligação
20 de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154 desta invenção, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de detectar a presença de células tumorais ou de células neoplásicas em um indivíduo que expressam uma proteína CD154 à qual o anticorpo desta invenção se liga especificamente. Um desses métodos para detectar a presença de células
25 tumorais ou de células neoplásicas em um indivíduo compreende as etapas de: administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD154 desta invenção, ou de uma composição farmacêutica que o compreende, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo e uma proteína; a depuração de qualquer agente de formação
30 de imagem não ligado do indivíduo; e a detecção da presença de qualquer complexo de anticorpo/proteína formado, a presença desse complexo indicando a presença de células tumorais ou de células neoplásicas no indivi-

duo.

Composições farmacêuticas

Esta invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-
5 CD154, como descrito nesta invenção.

Em uma modalidade desta invenção, a composição farmacêutica compreende pelo menos uma proteína de ligação de CD154, por exemplo, um anticorpo anti-CD154, desta invenção.

Em uma modalidade desta invenção, um anticorpo anti-CD154
10 não-glicosilado (ou outro anticorpo anti-CD154 com função efetora reduzida) da invenção, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de ligação a um antígeno de CD154 (por exemplo, o antígeno de CD154 que é ligado especificamente por hu5c8 não-glicosilado produzido pela linhagem de células que possui o N° de Acesso na ATCC PTA-4931), e
15 em que o anticorpo anti-CD154 não-glicosilado é caracterizado por ter uma mutação de N298Q (N297 com o uso da numeração EU de Kabat) e que ainda exibe função efetora reduzida, como aqui descrito em outra seção nesta especificação.

Em certas modalidades desta invenção, um anticorpo anti-
20 CD154 não-glicosilado (ou outro anticorpo anti-CD154 com função efetora reduzida), ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, não se liga a um receptor efetor. Em uma modalidade mais específica, um anticorpo anti-CD154 não-glicosilado, ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, é capaz de ligação à proteína CD154 que é ligada
25 especificamente por hu5c8 não-glicosilado produzido pela linhagem de células que possui o N° de Acesso na ATCC PTA-4931, e em que o anticorpo anti-CD154 não-glicosilado ou a composição farmacêutica não se liga a um receptor efetor.

Em uma modalidade específica desta invenção, um anticorpo
30 anti-CD154 não-glicosilado (ou outro anticorpo anti-CD154 ou proteína de ligação de CD154 com função efetora reduzida), ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, não causa trombose, incluindo aciden-

tes tromboembólicos. Em uma modalidade mais específica desta invenção, um anticorpo anti-CD154 não-glicosilado ou uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo é capaz de ligação à proteína CD154 que é ligada especificamente por hu5c8 não-glicosilado produzido pela linhagem
5 de células que possui o N° de Acesso na ATCC PTA-4931, e em que o anticorpo anti-CD154 não-glicosilado ou a composição farmacêutica não causa trombose.

Em outra modalidade desta invenção, as composições farmacêuticas podem ainda compreender qualquer um ou mais de um veículo
10 farmacêuticamente aceitável, um adjuvante, um veículo de liberação, um tampão e/ou um estabilizante. Técnicas exemplares para a formulação e administração dos anticorpos da presente invenção podem ser encontradas, por exemplo, em "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edição.

15 Em uma modalidade mais particular desta invenção, o veículo farmacêuticamente aceitável é solução salina tamponada com fosfato, soro fisiológico, água, formulações de citrato/sacarose/Tween e emulsões, por exemplo, emulsões óleo/água.

Em uma modalidade desta invenção, a composição farmacêutica pode ser liberada em um dispositivo de microencapsulação de modo a
20 reduzir ou evitar uma resposta imunológica do hospedeiro contra a composição. Os agentes de ligação, tais como anticorpos ou fragmentos de anticorpos desta invenção, também podem ser liberados microencapsulados em uma membrana como, por exemplo, um lipossomo ou outro veículo de liberação encapsulado ou imunoprotegido.
25

Em uma modalidade desta invenção, a composição farmacêutica pode estar na forma de uma preparação estéril injetável, por exemplo, uma suspensão estéril injetável aquosa ou oleaginosa. Essa suspensão pode ser formulada de acordo com metodologias conhecidas na técnica com a
30 utilização de agentes dispersantes, umidificantes e de suspensão adequados.

Em uma modalidade desta invenção, a composição farmacêuti-

ca pode ser liberada por via oral, tópica ou intravenosa. Quando administrada por via sistêmica, a composição terapêutica deve ser estéril, substancialmente livre de pirógenos e em uma solução parenteralmente aceitável em relação ao pH, à isotonicidade e à estabilidade. Por exemplo, uma preparação farmacêutica é substancialmente livre de materiais pirogênicos a fim de que seja adequada à administração com uma substância terapêutica humana. Essas condições são conhecidas por aqueles versados na técnica.

Em uma modalidade mais específica desta invenção, para administração oral, a composição farmacêutica é formulada em uma cápsula, um comprimido, uma suspensão ou uma solução aquosa adequada. Formulações sólidas das composições para administração oral podem conter veículos ou excipientes adequados, tais como amido de milho, gelatina, lactose, acácia, sacarose, celulose microcristalina, caulim, manitol, fosfato dicálcico, carbonato de cálcio, cloreto de sódio ou ácido algínico. Desintegrantes que podem ser usados incluem, sem limitação, celulose microcristalina, amido de milho, glicolato de amido de sódio e ácido algínico. Ligantes de comprimidos que podem ser usados incluem acácia, metilcelulose, carboximetilcelulose sódica, polivinilpirrolidona (Povidona[®]), hidroxipropil metilcelulose, sacarose, amido e etilcelulose. Lubrificantes que podem ser usados incluem estearatos de magnésio, ácido esteárico, silicone líquido, talco, ceras, óleos e sílica coloidal.

Em uma modalidade mais específica desta invenção, para aplicações tópicas, as composições farmacêuticas podem ser formuladas em uma pomada adequada. Alguns exemplos de formulações de uma composição para uso tópico incluem: gotas, tinturas, loções, cremes, soluções e pomadas que contêm o ingrediente ativo, e várias outras bases e veículos.

Em uma modalidade desta invenção, uma formulação tópica de pomada semissólida tipicamente compreende uma concentração do ingrediente ativo de cerca de 1 a 20%, por exemplo, 5 a 10%, em um veículo como, por exemplo, uma base de creme farmacêutica.

Em uma modalidade desta invenção, também podem ser preparadas composições farmacêuticas para inalação e composições transdérmicas.

cas. A composição terapêutica pode ser administrada através do nariz ou do pulmão, por exemplo, como um aerossol líquido ou em pó (liofilizado).

Em uma modalidade desta invenção, formulações líquidas de uma composição farmacêutica para administração oral preparada em água
5 ou em outros veículos aquosos podem conter vários agentes de suspensão, tais como metilcelulose, alginatos, tragacanto, pectina, kelgin, carragenina, acácia, polivinilpirrolidona e álcool polivinílico. As formulações líquidas das composições farmacêuticas desta invenção também podem incluir soluções, emulsões, xaropes e elixires que contêm, junto com o(s) composto(s) ati-
10 vo(s), agentes umidificantes, adoçantes, e agentes corantes e flavorizantes. Várias formulações líquidas e em pó das composições farmacêuticas podem ser preparadas por métodos convencionais para inalação nos pulmões do mamífero a ser tratado.

Em uma modalidade desta invenção, formulações líquidas de
15 uma composição farmacêutica para injeção podem compreender vários veículos, tais como óleos vegetais, dimetilacetamida, dimetilformamida, etil lactato, carbonato de etila, miristato de isopropila, etanol, polióis, isto é, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido, e similares. Em algumas modalidades, a composição inclui um veículo de citrato/sacarose/Tween. Para inje-
20 ções intravenosas, versões hidrossolúveis das composições podem ser administradas pelo método do gotejamento, em que uma formulação farmacêutica contendo o agente antifúngico e um excipiente fisiologicamente aceitável é infundida. Excipientes fisiologicamente aceitáveis podem incluir, por exemplo, dextrose 5%, solução salina 0,9%, solução de Ringer, ou outros excipi-
25 entes adequados. Uma forma insolúvel adequada da composição pode ser preparada e administrada como uma suspensão em uma base aquosa ou uma base oleosa farmacêuticamente aceitável como, por exemplo, um éster de um ácido graxo de cadeia longa, por exemplo, oleato de etila.

Em uma modalidade desta invenção, a composição farmacêutica
30 compreende de cerca de 0,1 a 90% em peso (por exemplo, 1 a 20% ou 1 a 10%) de um anticorpo anti-CD154 desta invenção, em um veículo farmacêuticamente aceitável.

Em uma modalidade desta invenção, a percentagem ótima do anticorpo anti-CD154 desta invenção em cada composição farmacêutica varia de acordo com a própria formulação e com o efeito terapêutico desejado nas patologias específicas e regimes terapêuticos correlacionados. A formulação farmacêutica é bem estabelecida na técnica. Métodos convencionais, conhecidos por aqueles versados nas técnicas da Medicina, podem ser usados para administrar a composição farmacêutica ao indivíduo.

Conseqüentemente, as composições farmacêuticas da presente invenção estão relacionadas às formulações de liberação prolongada. Liberação prolongada, ou liberação controlada ou liberação lenta, refere-se às formulações farmacológicas que liberam o fármaco ativo, por exemplo, um fármaco polipeptídico ou de anticorpo, ao longo de um período de tempo após a administração a um indivíduo. A liberação prolongada de fármacos polipeptídicos, que pode ocorrer ao longo de um intervalo de tempo desejado (por exemplo, minutos, horas, dias, semanas ou mais, dependendo da formulação farmacológica), difere de formulações padronizadas pelo fato de que substancialmente toda a unidade de dosagem está disponível para absorção imediata ou distribuição imediata através da corrente sanguínea. As formulações de liberação prolongada podem, em certas modalidades, resultar em um nível de fármaco circulante a partir de uma única administração que seja sustentada, por exemplo, por 8 horas ou mais, 12 horas ou mais, 24 horas ou mais, 36 horas ou mais, 48 horas ou mais, 60 horas ou mais, 72 horas ou mais, 84 horas ou mais, 96 horas ou mais, ou até mesmo, por exemplo, por 1 semana ou 2 semanas ou mais, por exemplo, 1 mês ou mais. As composições de liberação prolongada podem compreender um anticorpo monovalente anti-CD154 da presente invenção. Em modalidades adicionais, o anticorpo monovalente é um anticorpo humanizado ou um anticorpo totalmente humano. Em modalidades adicionais do anticorpo anti-CD154, o anticorpo anti-CD154 é um anticorpo com função efetora reduzida, como aqui descrito.

Em algumas modalidades desta invenção, a composição farmacêutica ainda compreende um composto imunossupressor ou imunomodula-

5 dor. Por exemplo, esse composto imunossupressor ou imunomodulador pode ser um dos seguintes: um agente que interrompe a sinalização coestimuladora de células T por meio de CD28; um agente que interrompe a sinalização de calcineurina, um corticosteroide, um agente antiproliferativo e um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína expressa na superfície de células imunológicas, incluindo, sem limitação, CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 e RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LT β e VLA-4.

10 Em algumas modalidades desta invenção, o composto imunossupressor ou imunomodulador é tacrolimus, sirolimus, micofenolato mofetil ou sua forma ativa, o ácido micofenólico, mizoribina, desoxispergualina, brequinar sódico, leflunomida, rapamicina ou azaspirano.

15 Em outras modalidades desta invenção, os anticorpos desta invenção ou as composições farmacêuticas que os compreendem podem ser incluídos em um recipiente, embalagem ou dispensador isoladamente ou como parte de um kit com rótulos e instruções para administração.

Administração e vias de liberação

20 Os anticorpos anti-CD154 desta invenção e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo por qualquer forma que seja medicamente aceitável. Para os objetivos desta invenção, "administração" significa qualquer um dos métodos de administração padronizados de um anticorpo, fragmento de anticorpo ou composição farmacêutica, conhecidos por aqueles versados na técnica, e não devem ser limitados aos exemplos aqui apresentados.

25 Em algumas modalidades desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo por injeção intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular, intramedular, intraventricular, intra-epidural, intra-arterial, intravascular, intra-articular, intrassinovial, intraesternal, intratecal, intra-hepática, intraespinal, intratumoral, intracraniana; por vias de administração enteral, intrapulmonar, transmucosa, intrauterina ou sublingual, 30 ou localmente, por exemplo, em locais de inflamação ou crescimento tumoral.

Em algumas modalidades desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo oral ou nasalmente, ou por inalação, por via oftálmica, retal ou tópica.

5 Em uma modalidade mais específica, os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo oralmente na forma de cápsulas, comprimidos, suspensões ou soluções aquosas.

10 Em uma modalidade mais específica, os anticorpos anti-CD154 desta invenção e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo topicamente por aplicação de um creme, pomada ou similar.

15 Em outras modalidades desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção, também podem ser administrados por inalação por meio do uso de um nebulizador, um inalador de pó seco ou um inalador de dose metrificada.

20 Em modalidades adicionais desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo por administração de liberação sustentada, com meios como injeções de depósito de implantes degradáveis aplicados diretamente durante cirurgia ou por implantação de uma bomba de infusão ou de um implante biocompatível de liberação sustentada no indivíduo.

25 Em uma modalidade mais específica, os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo por vias de administração injetáveis de depósito, por exemplo, usando materiais e métodos injetáveis ou biodegradáveis de depósito de 1, 3 ou 6 meses.

30 Em uma modalidade mais específica, os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo por aplicação na pele do indivíduo de um emplastro transdérmico que contém o anticorpo, derivado de anticorpo ou com-

posição farmacêutica, e deixando o emplastro em contato com a pele do indivíduo, geralmente por 1 a 5 horas por emplastro.

5 Em outras modalidades desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo em qualquer dose por peso corporal e qualquer frequência de dosagem que seja medicamente aceitável. A dosagem aceitável inclui uma faixa entre cerca de 0,01 e 200 mg/kg de peso corporal do indivíduo.

10 Em qualquer um dos métodos de utilização dos anticorpos ou das composições farmacêuticas desta invenção, os anticorpos ou as composições farmacêuticas podem ser administrados a um indivíduo em dose única ou em múltiplas doses diariamente, a cada 2, 3, 4, 5 ou 6 dias, semanalmente, mensalmente ou em qualquer fração ou múltiplo das mesmas, e ainda podem ser administrados a um indivíduo repetidamente em intervalos que
15 variam entre todos os dias até em meses alternados, como determinado por aqueles versados na técnica.

Em qualquer um dos métodos de utilização dos anticorpos ou das composições farmacêuticas desta invenção, as proteínas de ligação, anticorpos ou composições farmacêuticas que os compreendem podem ser
20 administrados a um indivíduo que deles necessita em intervalos pelo tempo que for medicamente indicado, variando de dias ou semanas até por toda a vida do indivíduo. Em modalidades adicionais, os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados a um indivíduo repetidamente em intervalos que variam entre
25 todos os dias até em meses alternados.

Em uma modalidade desta invenção, os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados em várias doses por dia, se desejado, para se obter a dose diária total desejada. A eficácia do método de tratamento pode ser avaliada
30 por monitoramento do indivíduo quanto aos sinais ou sintomas conhecidos de um distúrbio.

Para todas as modalidades desta invenção, a dosagem e a taxa

de dose dos anticorpos anti-CD154 desta invenção e das composições farmacêuticas desta invenção eficazes para produzir os efeitos desejados dependerão de diversos fatores, tais como a natureza da doença a ser tratada, o tamanho e a idade do indivíduo, o objetivo do tratamento, a composição farmacêutica específica usada, a farmacocinética do agente ativo, e a avaliação do médico responsável pelo tratamento.

Consequentemente, os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção serão administrados em uma quantidade eficaz para se alcançar seu objetivo desejado. Uma quantidade terapêuticamente eficaz pode se referir a uma quantidade de anticorpo eficaz para evitar, aliviar ou melhorar os sintomas de doença ou para prolongar a sobrevivência do indivíduo tratado. Uma quantidade terapêuticamente eficaz pode ser obtida por alteração da dose e da posologia de administração dos anticorpos em questão.

Os anticorpos anti-CD154 desta invenção, e as composições farmacêuticas desta invenção podem ser administrados como uma dosagem única para certas indicações como, por exemplo, para evitar a resposta imunológica a um antígeno ao qual um indivíduo é exposto por um tempo curto, por exemplo, um antígeno exógeno administrado em um único dia de tratamento. Exemplos de uma terapia desse tipo incluiriam a coadministração do fragmento de anticorpo da invenção junto com um agente terapêutico, por exemplo, uma substância farmacêutica antigênica, um alérgeno ou um produto do sangue ou um vetor de terapia gênica. Em indicações nas quais um antígeno está presente cronicamente, por exemplo, no controle de uma reação imunológica a um tecido transplantado ou a substâncias farmacêuticas antigênicas administradas cronicamente, os fragmentos de anticorpos ou as composições farmacêuticas da invenção são administrados em intervalos pelo período de tempo que for indicado medicamente, que varia de dias ou semanas até por toda a vida do indivíduo.

Em qualquer um dos métodos aqui descritos, os anticorpos ou as composições farmacêuticas podem ser administrados a um indivíduo com um segundo agente. Em certas modalidades, o agente é um agente terapêu-

tico como, por exemplo, um agente imunomodulador ou imunossupressor. O agente imunomodulador ou imunossupressor pode ser qualquer um dos seguintes:

- 5 (a) um agente que interrompe a sinalização coestimuladora de células T por meio de CD28;
 - (b) um agente que interrompe a sinalização de calcineurina,
 - (c) um corticosteroide,
 - (d) um agente antiproliferativo; e
 - (e) um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína
- 10 expressa na superfície de células imunológicas, incluindo, sem limitação, CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 e RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LT β e VLA-4. O composto imunossupressor ou imunomodulador pode ser, por exemplo, tacrolimus, sirolimus, micofenolato mofetil, mizorubina, desoxispergualina, brequinar sódico, leflunomida, rapamicina ou azaspirano. O anticorpo e se-
- 15 gundo agente podem ser administrados simultânea ou sequencialmente.

Em alguns casos, pode ser vantajoso administrar um ou mais ácidos nucleicos da invenção a um indivíduo que deles necessita. Métodos terapêuticos e diagnósticos da invenção que compreendem a etapa de administração de pelo menos um ácido nucleico da invenção de acordo com métodos bem-conhecidos estão incluídos no escopo da presente invenção.

20

Em uma modalidade desta invenção, o indivíduo que pode ser tratado pelos métodos descritos acima é um animal. De preferência, o animal é um mamífero. Exemplos de mamíferos que podem ser tratados incluem, sem limitação, seres humanos, primatas não-humanos, roedores (incluindo ratos, camundongos, hamsters e porquinhos-da-índia), vacas, cavalos,

25 carneiros, cabras, porcos, cães e gatos. De preferência, o mamífero é um ser humano.

Esta invenção pode ser mais bem compreendida com base nos Exemplos a seguir. No entanto, aqueles versados na técnica observarão prontamente que os métodos e resultados específicos discutidos são meramente ilustrativos da invenção, como aqui descrita.

30

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir ilustram os métodos e os produtos da presente invenção. Modificações e adaptações adequadas das condições e parâmetros descritos normalmente encontrados na técnica de biologia molecular que são evidentes para aqueles versados na técnica estão incluídos no espírito e escopo da presente invenção.

EXEMPLO 1: GERAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CD154 HUMANO POR SLAM

O Método de Anticorpo de Linfócito Seleccionado (SLAM) (Babcock e outros, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 7.843-7.848; WO 92/02551; de Wildt e outros, 1997, *J. Immunol. Methods*, 207: 61-67 e Lagerkvist, e outros, 1995, *BioTechniques* 18: 862-869) foi identificado para identificar e isolar anticorpos anti-CD154 humano. SLAM permite que sejam isoladas células produtoras de anticorpos de alta afinidade gerados durante respostas imunológicas *in vivo* de qualquer espécie. As células produtoras de anticorpo isoladas individuais são então expandidas de forma clonal, seguido por rastreamento daqueles clones que produzem anticorpos anti-CD154, seguido pela identificação da sequência de seus genes da cadeia variável pesada (V_H) e leve (V_L). Um método de rastreamento em particular é detalhado no WO 04/051268. Dessa forma, foram isoladas células B que são positivas para os anticorpos para o CD154 humano.

Vários anticorpos de rato anti-CD154 humano foram identificados e isolados usando a tecnologia SLAM (Figura 12). Um desses anticorpos, CA081 00342 (o "anticorpo 342"), foi humanizado, como descrito no exemplo seguinte. Seu DNA e suas sequências de aminoácidos deduzidas são mostrados na Figura 2. O gene que codifica esse anticorpo foi clonado.

EXEMPLO 2: HUMANIZAÇÃO DE CA081 00342 – CRIAÇÃO DE 342.G2

O anticorpo 342 SLAM foi humanizado por enxerto das CDRs em estruturas de linhagem germinativa humana. Alinhamentos da sequência do anticorpo de rato (doadora) com as estruturas de linhagem germinativa humana (receptoras) são mostrados na Figura 9, junto com a sequência humanizada projetada. A sequência receptora da cadeia leve da linhagem germinativa escolhida foi a região V humana VK1 2-1-(1) O12 mais a região

J JK1 (V BASE, "MRC Centre for Protein Engineering", GB; SEQ ID NO: 35 e 36) (Figura 3). A sequência receptora da cadeia pesada da linhagem germinativa escolhida foi a região V humana VH3 1-1 3-66 mais a região J JH4 (V BASE, "MRC Centre for Protein Engineering", GB; SEQ ID NO: 37 e 38) (Figura 3). Além disso, uma estrutura receptora principal de VH diferente foi escolhida, a sequência humana VH4 1-1 4-59 (SEQ ID NOS: 39 e 40) (Figura 3). As CDRs enxertadas da sequência doadora para a sequência receptora são como definidas por Kabat (Kabat e outros "Sequence of proteins of immunological interest" (1987). Bethesda MD, "National Institutes of Health", EUA), com a exceção da CDR-H1, em que é usada a definição combinada de Chothia/Kabat (vide WO 91/09967). Para enxertos em que somente as CDRs foram transferidas do anticorpo doador nas estruturas principais receptoras, foram construídas versões nas quais resíduos da estrutura doadora cruciais também foram incluídos. Esses resíduos foram identificados usando um método baseado naquele descrito no WO 91/09967. Por exemplo, o enxerto da cadeia leve VK1 gL4 contém resíduos doadores nas posições 38, 71 e 85; o enxerto da cadeia pesada VH3 gH1 contém resíduos da estrutura doadora nas posições 24, 48, 49, 73 e 78; o enxerto da cadeia pesada VH4 gH1 contém estruturas doadoras nas posições 48, 71 e 78. As sequências de todos esses enxertos são mostradas na Figura 9.

Os genes que codificam essas sequências da região V foram projetados e construídos com a utilização de técnicas padronizadas de biologia molecular por empresas de síntese de genes contratadas (Entelechon GmbH; DNA 2.0; Blue Heron). Foram feitas modificações para criar variantes enxertadas usando mutagênese-padrão oligonucleotídeo-dirigida com o uso de PCR. As sequências peptídicas sinalizadoras dos anticorpos de rato originais foram incluídas nos designs do gene original, para permitir a expressão com o uso de vetores de expressão de célula de mamífero.

Os genes da cadeia leve enxertados foram subclonados em um vetor de expressão de cadeia leve, que contém DNA que codifica a região constante C-capa humana (alótipo Km3). Os genes da cadeia pesada enxertados foram subclonados em um vetor de expressão de gama-4 humana,

que contém DNA que codifica a região constante gama-4 humana contendo a mutação de estabilização da dobradiça S241P (Angal e outros, *Mol Immunol.* 1993, 30 (1): 105-8). Qualquer vetor de expressão adequado pode ser usado. Os genes de anticorpo de rato originais também foram subclonados nesses vetores, criando plasmídeos que expressam o anticorpo quimérico da região V de rato/região C humana como um padrão de avaliação em ensaios.

A cotransfecção de plasmídeos do gene da cadeia leve e do gene da cadeia pesada em células CHO permitiu a expressão de IgG e a análise da ligação de CD154 humano por Biacore®.

A fim de analisar a expressão em *E. coli* e a atividade como um Fab' monovalente, os genes para construtos cruciais foram subclonados no vetor de expressão pTTOD (Fab) (WO 03/48208, WO 03/031475). A subclonagem foi obtida em um processo em 2 estágios: primeiro, o fragmento do gene de VK foi clonado como um fragmento EcoRV - BsiWI; a seguir, o fragmento do gene de VH foi clonado como um fragmento PvuII - XhoI. Esse processo funde o DNA que codifica o peptídeo sinalizador da proteína OmpA aos genes que codificam tanto cadeias leves quanto pesadas, conferindo secreção da proteína traduzida ao periplasma bacteriano. Os plasmídeos de expressão resultantes foram transformados em *E. coli* K-12 cepa W3110 e usados em experimentos de indução em frascos de agitação de pequena escala e para fermentação em densidade celular elevada.

Tabela 1

Afinidade de construtos de Fab de 342 por Biacore®

(Fab purificado de fermentação de 1 litro)

Enxerto	kA (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)
gL4gH1	1,53E+07	6,97E-05	4,55E-12	4,55

A seleção do enxerto ótimo foi feita levando-se em consideração tanto a atividade no ensaio quanto os níveis de expressão de Fab na fermentação de *E. coli*. Um exemplo de determinação da afinidade por Biacore® é mostrado na Tabela 1. A partir desses dados, o enxerto gL4gH1 foi escolhido.

Foi feito um plasmídeo que codifica uma versão Fab' do enxerto gL4gH1. A sequência de DNA do inserto de inserção desse enxerto é mostrada na Figura 8 (SEQ ID NO: 41). A Figura 8 também fornece a sequência de um inserto (SEQ ID NO: 28) para a expressão de um fragmento Fab, que
5 pode ser usada para fazer um fragmento F(ab)₂.

EXEMPLO 3: CRIAÇÃO DE ANTICORPOS HU5C8 E HU342 NÃO-GLICOSILADOS POR MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA

Os anticorpos hu5c8 e hu342 não-glicosilados usados em experimentos subsequentes foram criados usando técnicas padronizadas de DNA
10 recombinante. O hu5c8 não-glicosilado foi feito substancialmente como descrito na US2006/0193856, exceto pela substituição do domínio Fc de hulgG4 pelo domínio Fc de IgG1 usado previamente, a fim de reduzir ainda mais a função efetora. A sequência da cadeia leve capa do hu5c8 não-glicosilado é mostrada na Figura 13 (SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 e SEQ ID NO: 64).
15 A cadeia pesada de hu5c8 não-glicosilado contém duas mutações feitas por mutagênese sítio-dirigida nos domínios CH2 (T299A, Kabat EU) e da dobradiça (S228P Kabat EU) (Figura 14; SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 e SEQ ID NO: 67). A mutação T299A modifica o sítio de N-glicosilação no domínio CH2 de forma que ele deixa de ser um substrato para as enzimas de N-
20 glicosilação, tornando a molécula não-glicosilada.

O anticorpo hu342 não-glicosilado foi derivado do vetor do fragmento Fab de 342. Essa sequência foi modificada por adição de sequências sinalizadoras humanas e das sequências adequadas do domínio constante humano. O anticorpo hu342 não-glicosilado também compreende um domí-
25 nio Fc de hulgG4. A sequência da cadeia leve capa de hu342 não-glicosilado é mostrada na Figura 15 (SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 e SEQ ID NO: 70). A cadeia pesada de hu342 não-glicosilado contém duas mutações feitas por mutagênese sítio-dirigida nos domínios CH2 (T299A, Kabat EU) e da dobradiça (S228P Kabat EU) (Figura 16; SEQ ID NO: 71, SEQ ID
30 NO: 72 e SEQ ID NO: 73). A mutação T299A modifica o sítio de N-glicosilação no domínio CH2 de modo que ele não é mais um substrato para as enzimas de N-glicosilação, tornando a molécula não-glicosilada. hu5c8 e

hu342 não-glicosilados foram expressos de forma estável em células CHO.

EXEMPLO 4: LIGAÇÃO AO CD154: MEDIDAS DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO

A tecnologia Biacore® monitora a ligação entre biomoléculas em tempo real e sem a necessidade de marcação. Uma das substâncias que interagem, denominada ligante, é imobilizada diretamente ou capturada na superfície imobilizada, enquanto a outra, denominada analito, flui em solução sobre a superfície capturada. O sensor detecta a mudança da massa na superfície sensora à medida que o analito se liga ao ligante para formar um complexo na superfície. Esse corresponde ao processo de associação. O processo de dissociação é monitorado quando o analito é substituído por tampão. No ensaio de afinidade Biacore®, o ligante é um anticorpo anti-CD154 como, por exemplo, o anticorpo 342, e o analito é o domínio extracelular de CD154 humano.

Os detalhes do método são os seguintes:

Instrumento: Biacore® 3000, Biacore AB, Uppsala, Suécia.

Chip sensor: CM5 (grau de pesquisa). Número de catálogo: BR-1001-14, Biacore AB, Uppsala, Suécia. Os chips foram armazenados a 4°C.

Solução BIAnormalising: Glicerol 70% (p/p). Parte do Kit BIAmaintenance. Número de catálogo: BR-1002-51, Biacore AB, Uppsala, Suécia. O kit BIAmaintenance foi armazenado a 4°C.

Kit de acoplamento de amina: Número de catálogo: BR-1000-50, Biacore AB, Uppsala, Suécia. Cloridrato de etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). Completado até 75 mg/ml em água destilada e armazenado em alíquotas de 200 µl a -70°C. N-hidroxissuccinimida (NHS). Completada até 11,5 mg/ml em água destilada e armazenada em alíquotas 200 de µl a -70°C. Cloridrato-NaOH de etanolamina 1 M pH 8,5. Armazenado em alíquotas 200 de µl a -70°C.

Tampões: O tampão de corrida é HBS-EP (sendo HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensoativo P20 0,005 %). Número de catálogo: BR-1001-88, Biacore AB, Uppsala, Suécia. Tampão armazenado a 4°C. O tampão de imobilização é Acetato 5,0 (sendo acetato de sódio 10 mM

pH 5,0). Número de catálogo: BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Suécia. Tampão armazenado a 4°C.

Captura de ligante: fragmento F(ab')₂ *Affinipure* de cabra anti-IgG humana, fragmento Fab' específico (Número de catálogo: 109-006-097) ou fragmento Fc específico (Número de catálogo: 109-006-098), Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, EUA). Reagentes armazenados a 4°C.

Ligante: anticorpos anti-CD154.

Analito: domínio extracelular recombinante de CD154 humano. O material foi preparado a 2 mg/ml (40 µM) em solução salina tamponada com fosfato, armazenado a 4°C e diluído em tampão de corrida HBE-EP para os ensaios. Tipicamente, CD154 foi diluído de -1 nM a -100 pM por duplicação de diluições para o ensaio de afinidade.

Solução de regeneração: HCl 40 mM preparado por diluição com água destilada a partir de uma solução de estoque de 11,6 M (BDH, Poole, Inglaterra. Número de catálogo: 101254H). NaOH 5 mM preparado por diluição com água destilada a partir de uma solução de estoque de 50 mM. Número de catálogo: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Suécia.

Método do ensaio: BIA ("Biomolecular Interaction Analysis") foi realizada com o uso de um Biacore® 3000 (Biacore AB). O fragmento F(ab')₂ *Affinipure* de cabra anti-IgG humana, fragmento Fc ou Fab'-específico (Jackson ImmunoResearch) foram imobilizados em um Chip Sensor CM5 por meio de química de acoplamento de amina até um nível de captura de 6.000 unidades de resposta (RUs). Tampão HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensoativo P20 0,005 %, Biacore AB) foi usado como o tampão de corrida com uma taxa de fluxo de 10 µl/min. Os anticorpos anti-CD154 ou fragmentos Fab foram usados em concentrações tais que, uma vez capturados pela superfície imobilizada de Fc anti-IgG humana (ou Fab' anti-IgG humana), geravam um sinal de aproximadamente 200 RUs. CD154 humano foi titulado sobre o anticorpo capturado, em várias concentrações. Noventa µl de CD154 foram injetados sobre a superfície (fase de associação), seguida por uma fase de dissociação de 240 segundos, todas em uma taxa de fluxo de 30 µl/min. A superfície foi regenerada por duas injeções de

10 μ l de HCl 40 mM, seguidas por uma injeção de 5 μ l de NaOH 5 mM em
uma taxa de fluxo de 10 μ l/min. As curvas de ligação com subtração do nível
de fundo foram analisadas com o uso do software "BIAevaluation" (versão
3.2) de acordo com procedimentos padronizados. Os parâmetros cinéticos
5 foram determinados pelo algoritmo de ajuste.

Esse método pode ser usado para avaliar a afinidade por uma
proteína CD154, ou um fragmento desta, de qualquer anticorpo, derivado de
anticorpo ou fragmento de anticorpo desta invenção. Os valores de K_d obti-
dos por Biacore® para anticorpos anti-CD154 isolados por SLAM são mos-
10 trados nas Figuras 12 e 18.

EXEMPLO 5: INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DE CD40

Um ensaio baseado em citometria de fluxo foi usado para avali-
ar a ligação de CD40 marcado às células D1.1 que expressam CD154. As
células Jurkat D1.1 ("American Type Culture Collection") foram mantidas em
15 meio RPMI 1640 (Gibco, 31870-025) contendo soro fetal de bezerro (FCS)
10% (v/v), glutamina 2 mM (Invitrogen, 23030024), piruvato de sódio 1 mM
(Invitrogen, 11360-039), D-(+)- glicose 1% (v/v) (Sigma, 08769) e HEPES 10
mM (Sigma, H0887). No momento do ensaio, 100.000 células D1.1 foram
incubadas em 100 μ l de meio RPMI 1640 + FCS 10%, na presença ou au-
20 sência de anticorpo anti-CD154 diluído serialmente por 15 minutos em tem-
peratura ambiente. Cinco μ l de uma diluição 1:75 de hCD40-mFc-PE (Alexis
Corp, ANC-504-050) foram então adicionados e incubados por mais 30 mi-
nutos em temperatura ambiente. Após lavagem duas vezes em solução sali-
na tamponada com fosfato (PBS) contendo albumina sérica bovina 1% (p/v)
25 (fração de BSA V, Serologicals Proteins Inc, 81- 068-5) e azida de sódio
0,02% (p/v) (BDH, 103692K), as células foram ressuspensas em 200 μ l de
PBS/BSA 1%/azida de sódio 0,02%, e a citometria de fluxo realizada em um
FACScan Becton Dickinson. Os valores para a média geométrica da fluores-
cência (FL2) foram avaliados em todos os casos. A inibição da ligação de
30 hCD40-mFc-PE foi calculada em relação ao sinal na ausência de anticorpo
(0% de inibição) e no sinal na ausência de hCD40-mFc-PE (100% de inibi-
ção), usando a fórmula:

$$\frac{0\% \text{ de Inibição} - \% \text{ do Teste}}{0\% \text{ de Inibição} - 100\% \text{ de Inibição}} \times 100$$

Os valores da IC₅₀ a partir dos dados foram obtidos usando XLfit como parte da suíte "Activity Base".

- 5 Os valores da IC₅₀ da ligação de CD40 para anticorpos anti-CD154 isolados por SLAM são mostrados nas Figuras 12 e 18.

EXEMPLO 6: ENSAIO DE COMPETIÇÃO DE LIGAÇÃO

- Um ensaio baseado em citometria de fluxo foi usado para avaliar a ligação de anticorpo anti-CD154 às células D1.1 que expressam CD154.
- 10 As células Jurkat D1.1 ("American Type Culture Collection") foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco, 31870-025) contendo soro fetal de bezerro (FCS) 10% (v/v), glutamina 2 mM (BioWhittaker, 17-605E) e 1 Penicilina-Estreptomicina (Mediatech, 30002107). No momento do ensaio, 100.000 células D1.1 foram incubadas em 10 ml de PBS, BSA 0,1%, azida de sódio
- 15 0,02% (tampão de FACS), na presença ou ausência de anticorpo anti-CD154 diluído serialmente e Fab anti-CD154 biotinilado (clone 342) por 2 horas a 4°C. As células foram lavadas três vezes em tampão de FACS com centrifugação a 290 xg por 3 minutos entre as lavagens. Uma diluição de
- 20 1:500 de um conjugado de estreptavidina-R-ficoeritrina (Jackson Immunoresearch, 016-110-084) em 150 µM de tampão de FACS foi adicionada, e as células foram incubadas por uma hora a 4°C. As células foram lavadas uma vez e fixadas em PBS com formaldeído 3% em temperatura ambiente por 10 minutos. As células foram ressuspensas em tampão de FACS e processadas em um FacsCalibur (BD). Os valores para a média geométrica da fluo-
- 25 rescência (FL2) foram avaliados em todos os casos. A ligação Biotina/Fab 342 foi tabulada contra a concentração de anticorpo de competição para se obter curvas de inibição sigmóides que foram ajustadas a uma curva de quatro parâmetros com a utilização do software GraphPad Prism. Os valores da IC₅₀ gerados neste ensaio são mostrados na Figura 18.

EXEMPLO 7: ENSAIO DE SUPRARREGULAÇÃO DE ICAM-1

A habilidade dos anticorpos anti-CD154 para inibir as interações da superfície celular de CD40L:CD40 foi medida em um ensaio de potência

de cocultura *in vitro*. A ligação de CD40 com CD154 (CD40L) ativa linfócitos B resultando em uma suprarregulação de CD54 (ICAM-1) na superfície celular, e essa ativação de células B dependente do contato de CD40L:CD40 pode ser bloqueada por anti-CD154. Resumidamente, células T D1.1 Jurkat de linfoma (CRL-10915, "American Type Culture Collection" (ATCC), Manassas, VA, EUA) que expressam CD154 e células B Ramos de linfoma 2G6.4C10 (CRL-1923, ATCC) que expressam CD40 foram cocultivadas em uma incubadora a 37°C com CO₂ 5% de um dia para o outro em uma proporção de 1:4 com titulações de Fabs anti-CD154 ou um Ab intacto de controle (hu5C8). O ensaio foi realizado em placas com fundo redondo de 96 poços em uma concentração de 1 X 10⁶ células/ml em meio RPMI completo (RPMI com FBS 10%, L-glutamina 1%, piruvato de sódio 1% e HEPES 10 mM pH 6,8, Gibco BRL, Rockville, MD, EUA). No dia seguinte, as células foram coradas por uma hora a 4°C com CD20 FITC (#555622) e CD54 APC (#559771) de BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA) em uma concentração de 1:100 e 1:200, respectivamente, em PBS contendo BSA 1% e azida de sódio 0,1%. As células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 1% e analisadas em um Citômetro FACScan Calibur (BD Biosciences). A média geométrica da fluorescência das células ramificadas (células duplas positivas) versus a concentração de anti-CD154 (CD40L) foi ajustada para uma curva de 4 parâmetros com o uso do software DeltaGraph (Red Rock Software, Salt Lake City, UT, EUA) (Figuras 12 e 18). Os valores da IC₅₀ foram usados para determinar a potência relativa dos anticorpos anti-CD154.

EXEMPLO 8: ATIVIDADE EM MODELO EM MACACO CINOMOLGUS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

O modelo usado para demonstrar a atividade *in vivo* é descrito em Gobburu e outros (1998) *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* 286: 925. Os macacos *Cynomolgus* receberam doses i.v. únicas de solução salina, anticorpo Hu5c8 ou uma resposta de dose de Fab' de 342-PEG, 4 horas antes do ataque com uma única dose i.m. de 0,5 ml de toxoide tetânico (TT). Cada grupo de tratamento continha 3 machos e 3 fêmeas. No 30º dia, foi dada uma segunda dose de inibidor, e os animais foram atacados novamente com

TT (a resposta secundária). Foram coletadas amostras de sangue em períodos de tempo selecionados por até 50 dias para análise das titulações de IgG e IgM anti-TT (Figuras 19 e 21). Os dados mostram que Fab' de 342-PEG inibe a resposta imunológica de IgG e IgM ao TT de uma forma dose-dependente.

As titulações de IgG anti-TT em macacos cinomolgus também foram medidas após tratamento com uma dose única (20 mg/kg para hu5c8, 5c8 não-glicosilado e 342 não-glicosilado e 40 mg/kg para Fab' de 342-PEG e 342 DFM-PEG) de várias formas de anticorpos anti-CD154 (Figura 20). A inibição da resposta imunológica ao TT foi observada com todos os anticorpos avaliados.

EXEMPLO 9: ENSAIO DE BLOQUEIO CRUZADO DA SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ATIVADA POR FLUORESCÊNCIA

As propriedades de ligação dos fragmentos Fab' anti-CD154 da invenção foram estudadas por ensaios de anticorpo de bloqueio cruzado. Resumidamente, células Jurkat D1.1 que expressam CD154 foram incubadas com meio ou 10 µg/ml de um primeiro Fab' anti-CD154 não marcado por 60 minutos em temperatura ambiente. Sem lavagem, uma diluição ótima de um segundo Fab' anti-CD154 marcado com Alexa Fluor 488 (300 ng/ml) foi adicionada por 60 minutos. As células foram então lavadas e analisadas por citometria de fluxo. Caso o primeiro e o segundo Fab' se liguem ao mesmo epitopo, o primeiro Fab' bloqueará competitivamente a ligação do segundo Fab'. Caso os dois anticorpos se liguem a epitopos diferentes, o primeiro Fab' não bloqueará a ligação do segundo Fab'. Caso o segundo Fab' marcado testado seja de 342, pode ser demonstrado que o Fab' de 342 é bloqueado de forma cruzada por Fab' de 338 (Figura 23B), 381 (Figura 23D) e 335 (Figura 23G), mas não é bloqueado de forma cruzada por Fab' de 295 (não mostrado), 402 (Figura 23C), 300 (Figura 23E), 303 (Figura 23H) ou 294 (Figura 23F). Quando o Fab' marcado é de hu5c8, o bloqueio cruzado por Fab' de 338 (Figura 24A), 402 (Figura 24B), 381 (Figura 24C), 303 (Figura 24D), 335 (Figura 24E), 300 (Figura 24F) e 294 (Figura 24G) pode ser demonstrado. O teste com A33 (um anticorpo de controle com isótipo compatível) con-

firma que não há bloqueio cruzado não específico (Figuras 23A e 24H). Os anticorpos 342 e hu5c8 competem entre eles pela ligação de CD154, independentemente de qual era o Fab' não marcado (primeiro) e marcado (segundo).

5 EXEMPLO 10: ANÁLISE BIACORE® DE LIGAÇÃO DE ANTICORPO

A análise Biacore® da ligação do anticorpo 342 e hu5c8 à proteína CD154 solúvel (sCD154) (domínio extracelular; ECD) indicou que 342 deslocou a ligação de hu5c8 ao sCD154 quando adicionado ao sCD154 em segundo lugar (Figuras 25 A e B). 5c8 não foi capaz de deslocar 342 de sCD154 quando adicionado ao sCD154 em segundo lugar (Figura 25 C). O anticorpo 338 se comportou de forma similar ao 342 com relação aos resultados não recíprocos no ensaio de competição de hu5c8.

O Fab de Hu5c8 pode se ligar a um complexo de 342 de comprimento completo (FL)/sCD154 (Figura 25D). Esse resultado sugere que o Fab de hu5c8 não compete com o sítio de ligação de 342 FL quando 342 FL é adicionado primeiro. Sem se prender a uma teoria, esses resultados sugerem que a ligação de um ou dois braços do trímero de sCD154 por 342 não evita a ligação de hu5c8 ao(s) braço(s) "livre(s)".

Há um ligeiro aumento (aproximadamente 20 RU) na ligação quando Fab de hu5c8 é seguido por Fab' de 342 (Figura 25E). Esse resultado desperta a possibilidade de que o Fab' de hu5c8 tenha bloqueado a ligação de Fab' de 342 ou que o Fab' de 342 tenha substituído o Fab' de hu5c8 no sCD154 capturado.

Nem o Fab' de 342 nem o Fab' de hu5c8 se liga a um complexo de CD40:sCD154 ou afeta a dissociação do complexo em um ensaio de proteína. O fato de que nenhum desses Fab' pode se ligar ao complexo de CD40:sCD154 sugere que o complexo utiliza todos os três braços do sCD154 ou que o complexo impede estericamente acesso dos Fab's a um braço "livre".

30 EXEMPLO 11: ATIVAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS

Ensaio 1

A agregação plaquetária pode ser medida com a utilização de

ensaios publicados (por exemplo, Florian e outros (2005) *Thrombosis He-*
mostasis 93: 1137). Em um ensaio, as plaquetas foram lavadas do plasma
rico em plaquetas de um doador normal em solução salina tamponada com
HEPES em tubos revestidos com BSA, e ajustadas até 250.000 por microlitro (µl). As plaquetas lavadas foram então pipetadas em uma cubeta de um
5 agregômetro (Chrono-Log 490D) e o sinal do traçado foi calibrado para per-
centual de agregação zero, usando tampão HEPES (ensaio) para zerar.
Nesse instrumento, a cubeta é mantida a 37,0°C e uma barra magnética sili-
conada agita as plaquetas a 1.000 rpm. Complexos imunes totalmente for-
mados (isto é, anticorpo mais CD40L solúvel recombinante humano
(rhsCD40L), em estequiometria de 1: 1 em que rhsCD40L foi tratado como
trimérico) foram adicionados às plaquetas, e a agregação foi avaliada como
um traçado derivado pela densidade óptica da solução. Especificamente, 15
10 µl de complexo imune foram adicionados a 285 µl de suspensão de plaque-
tas lavadas, de tal forma que, após a adição à cubeta, a concentração final
de sCD40L fosse de 10 µg/ml e a de anticorpo IgG fosse de 27,8 µg/ml ou
16,7 µg/ml para Fab'-PEG. Os dados mostram que a agregação ocorre na
presença do anticorpo IgG Hu5c8 anti-CD40L intacto, mas não com Fab' de
342-PEG (Figura 26).

20 Ensaio 2

Em outro ensaio descrito no WO 07/59332, a agregação plaque-
tária é medida por contato das plaquetas com uma agente de ativação de
plaquetas (por exemplo, adenosina difosfato (ADP), colágeno, trombina,
tromboxano, elastase de neutrófilo, p-selectina ou convulxina), o contato das
25 plaquetas ativadas com um anticorpo anti-CD154, e depois o contato das
plaquetas ativadas com um agente de entrecruzamento (por exemplo,
CD154 solúvel (sCD154), anticorpo anti-IgG humana, anticorpo anti-hFc, RF,
célula acessória receptor Fc-positiva, proteína solúvel A ou receptor Fc hu-
mano solúvel). A agregação é então quantificada por sedimentação de pla-
30 quetas, em que a sedimentação de plaquetas é indicativa de agregação das
plaquetas. O ensaio de agregação foi realizado em plasma rico em plaque-
tas (PRP). Aproximadamente 50 ml de sangue total foram coletados em alí-

quotas em tubos *vacutainer* de 4,5 ml contendo 0,5 ml de citrato de sódio 3,8%. O PRP foi preparado por centrifugação do sangue anticoagulado a 200 g por 10 minutos e coleta do sobrenadante. Para realizar o ensaio, o aparelho de definição de perfil de da agregação plaquetária de 4 canais Bio-
5 data (PAP-4; Biodata Corp., Hatboro, PA) foi zerado usando uma cubeta contendo apenas plasma pobre em plaquetas (PPP). Uma alíquota de 350 µl de PRP, contendo aproximadamente 2 a 5 x 10⁸/ml plaquetas, foi adicionada a uma cubeta contendo uma barra de agitação. Anticorpo anti-CD40L, IgG humana, soro humano normal, CD40-Fc ou anti-hFc foram adicionados em
10 um volume total de 100 µl. A cubeta carregada foi colocada na máquina e os componentes da reação misturados antes da adição de ADP.

A agregação foi iniciada com a adição da concentração subótima de ADP em 50 µl (a concentração final varia para cada amostra individual). O aparelho de definição do perfil de agregação possui quatro entradas,
15 que podem ser usadas simultaneamente. Foi gerado um traçado de agregação para cada amostra por quatro minutos após a adição de ADP. Ao final do traçado, o instrumento calcula a porcentagem de agregação por comparação da transmissão de luz através da amostra com a transmissão de luz através da zeragem com PPP. Foi realizada uma titulação no começo de
20 cada experimento, e foram feitas rodadas subseqüentes em uma concentração de ADP subótima.

Os resultados desse ensaio são mostrados na Figura 27. PRP foi obtido de um indivíduo saudável. A agregação foi induzida com 0,75 µM de ADP, que foi determinada como a concentração subótima para esse doador. Um anticorpo anti-CD154 de controle positivo e um hlgG de controle
25 negativo foram avaliados a 200 µg/ml e sCD154 a 30 µg/ml. O anticorpo anti-CD154 ou hlgG foi misturado com sCD154 recombinante por no mínimo 20 minutos, antes da adição à cubeta contendo PRP. As barras representam as médias e os desvios-padrão de dois pontos de dados. Os resultados mos-
30 tram que, embora IgG humana (hlgG) de controle negativo e sCD154 juntos não tenham tido efeitos sobre a agregação plaquetária, o anticorpo anti-CD154 de controle positivo aumentou a agregação plaquetária. Os resulta-

dos desse ensaio com a utilização de um controle positivo e negativo demonstram que esse ensaio pode ser usado para comparar o efeito relativo dos anticorpos da presente invenção sobre a agregação plaquetária.

Para determinar se as plaquetas expressam CD154 em sua superfície, as plaquetas podem ser incubadas com um conjugado de biotina-anticorpo anti-CD154, e a presença de CD154 de superfície determinada por quantificação do anticorpo anti-CD40L biotinilado ligado. Consequentemente, a expressão de superfície de CD154 foi avaliada após 1, 10, 20, 40 e 60 minutos de incubação, com ou sem 10 μ M de ADP. A expressão de superfície de CD40L era detectável em plaquetas ativadas por ADP logo após um minuto depois da ativação, e aumentava ao longo do tempo. A ligação de conjugado de biotina-anticorpo anti-CD154 é específica para CD154, na medida em que a pré-incubação do conjugado de biotina-anticorpo anti-CD154 com sCD154 inibiu a ligação às plaquetas ativadas. A quantidade de CD154 de superfície detectada em plaquetas inativadas ("em repouso") também aumentou ao longo do tempo. Esse fenômeno é atribuível provavelmente ao nível basal de ativação plaquetária sob as condições experimentais.

EXEMPLO 12: MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FUNÇÃO EFETORA ALTERADA DE ANTICORPOS NÃO-GLICOSILADOS E OUTROS ANTICORPOS VARIANTES

O exemplo a seguir descreve ensaios úteis para a determinação e caracterização de funções efetoras dos anticorpos não-glicosilados e de outros anticorpos variantes modificados da invenção.

A função efetora dos anticorpos não-glicosilados e de outros anticorpos variantes modificados da invenção pode ser caracterizada pela habilidade dos anticorpos para se ligar a um antígeno e também se ligar a um receptor Fc ou uma molécula de complemento como, por exemplo, C1q. Em particular, as afinidades de ligação por Fc γ R podem ser medidas com ensaios baseados na habilidade do anticorpo para formar uma "ponte" entre o antígeno de CD154 e uma célula que abriga um receptor Fc. A afinidade de ligação por C1q pode ser medida com base na habilidade do anticorpo para formar uma "ponte" entre o antígeno de CD154 e C1q. A interação dos anti-

corpos da presente invenção com um FcR ou com complemento também pode ser medida na tecnologia baseada em glóbulos "AlphaScreene" (Perkin Elmer®).

Ensaio de ligação de receptor Fc

5 O ensaio de ponte com Fc γ R pode ser realizado por revestimen-
to de placas de ELISA de 96 poços Maxisorb (Nalge-Nunc Rochester, NY,
EUA) com ligante de CD154 solúvel humano recombinante (por exemplo, em
uma concentração de 1 μ g/ml de um dia para o outro a 4°C em PBS; Karpus-
10 sas e outros 1995 *Structure* 3 (10): 1.031-1.039 e 3 (12): 1.426 e Karpusas e
outros 2001 *Structure* 9 (4): 321-329). As titulações de formas glicosiladas
ou não-glicosiladas do anticorpo anti-CD154 são ligadas ao CD154 por 30
minutos a 37°C, as placas são então lavadas, e a ligação de células U937
marcadas de forma fluorescente (CD64+) é medida. As células U937 podem
15 ser desenvolvidas em meio RPM com FBS 10%, HEPES 10 mM, L-
glutamina e penicilina/estreptomicina, divididas 1:2, e ativadas por um dia,
antes do ensaio com 1.000 unidades/ml de IFN γ para aumentar a expressão
do receptor Fc (Fc γ RI).

Em outra variação do ensaio, a habilidade dos anticorpos da in-
venção para se ligar ou, em vez disso, não conseguir se ligar ainda a outro
20 receptor Fc como, por exemplo, Fc γ RIII (CD16), pode ser medida usando o
ensaio de formação de ponte acima contra células humanas T marcadas de
forma fluorescente (células Jurkat) transfectadas com construção de expres-
são de uma CD16. O ligante pode ser produzido por uma monocamada de
células de ovário de hamster chinês (CHO) que expressam CD154 em pla-
25 cas de cultura de tecido de 96 poços (Coming Life Sciences Acton, MA, EU-
A). Por exemplo, as células CHO-CD154⁺ são semeadas em placas de 96
poços a 1 X 10⁵ células/ml e desenvolvidas até a confluência em oc-MEM
com FBS 10% dialisado, 100 nM de metotrexato, L-glutamina e penicili-
na/estreptomicina (GibcoBRL Rockville, MD, EUA). As células Jurkat CD16⁺
30 são desenvolvidas em RPMI com FBS 10%, 400 pg/ml de Geneticina, 10
mM de HEPES, piruvato de sódio, L-glutamina e penicilina/estreptomicina
(GibcoBRL), e divididas 1:2 um dia antes do ensaio.

Nos ensaios para ambos os receptores, as células que abrigam o receptor Fc podem ser marcadas com éster acetoximetílico de 2',7'-bis- (2-carboxietil)-5-(e-6)-carboxifluoresceína (BCECF- AM) (Molecular Probes Eugene, OR, EUA) por 20 minutos a 37°C. Após lavagem para remover o excesso de marcador, 1 x 10⁵ das células marcadas são incubadas no ensaio por 30 minutos a 37°C. As células FcγR-positivas não ligadas são removidas por lavagens várias vezes e as placas são lidas em uma leitora de microplacas (Leitora de Microplacas Fluorescentes Cytofluor 2350, Millipore Corporation Bedford, MA, EUA) em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 nm.

Além dos ensaios descritos acima, a ligação dos anticorpos da presente invenção aos receptores Fc pode ser medida em um formato de competição usando um AlphaScreen[®] (Ensaio Homogêneo de Proximidade Luminescente Amplificado; Perkin Elmer) ou diretamente com o uso de ressonância de plasmônio de superfície (Biacore[®]). Os ensaios Biacore podem monitorar a ligação do receptor de analito ao anticorpo capturado em um chip de proteína A/G com a utilização de um instrumento Biacore[®] 3000. Biacore[®] é um método bem estabelecido para a caracterização de interações proteína-proteína (Myszka 1997 *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 50-57; Malmberg e Borrebaeck 1995 *J. Immunol. Methods* 183: 7-13), e foi usado com sucesso para medir a ligação de anticorpos IgG ao FcγRIII (Galon e outros, 1997 *Eur. J. Immunol.* 27: 1.928-1.932). Por exemplo, a proteína A/G é acoplada covalentemente a um chip sensor (por exemplo, um chip sensor CM5 usando química de NHS). Um tampão de corrida (por exemplo, HBS-EP (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensoativo P20 0,005% v/v, Biacore[®]) e um tampão de regeneração de chip (por exemplo, Glicina 1,5 (glicina-HCl 10 mM, pH 1,5, Biacore[®])) são usados no ensaio. Ao anticorpos anti-CD154 variantes com função efetora reduzida e anticorpos anti-CD154 do tipo selvagem ou nativos são diluídos até 100 nM em tampão de corrida (por exemplo, tampão HBS-EP) e são ligados ao chip de proteína A/G por 5 minutos. Os receptores são ligados na fase de associação em uma série de concentrações, seguida por uma fase de dissociação com

tampão. Um ciclo sem anticorpo fornece uma resposta de base. Os sensorgramas podem ser globalmente ajustados para um modelo de ligação Langmuir 1:1 para se obter as constantes de equilíbrio de dissociação (K_{DS}) com o uso do software BIAevaluation v 4.1 (Biacore®), por exemplo.

5 Os ensaios AlphaScreen utilizam anticorpo não marcado para realizar uma competição da interação entre glóbulos doadores de IgG biotinilada ligada à estreptavidina e glóbulos receptores de Fc γ R-His-GST ligado ao anti-GST. Um anticorpo anti-CD154 do tipo selvagem ou nativo (por exemplo, um anticorpo IgG1) é biotinilado usando métodos padronizados e

10 dialisado em PBS. Glóbulos receptores de anti-GST e glóbulos doadores de estreptavidina são disponíveis por vendedores comerciais e podem ser usados em uma concentração final de 20 μ g/ml. Fc γ RI-His-GST, Fc γ RIIIa-His-GST, Fc γ RIIIa-His-GST ou qualquer outro FcR marcado, em tampão de ensaio 1x (por exemplo, HEPES 25 mM, NaCl 100 mM, BSA 0,1%, Tween 20

15 0,01%, pH 7,4), é distribuído em cada poço de uma placa de 96 poços até uma concentração final de 0,5 nM. Anticorpo anti-CD154 do tipo selvagem ou nativo, anticorpo variante anti-CD154 ou tampão é preparado como diluições de $\frac{1}{2}$ log em tampão de ensaio 1x, e dividido em alíquotas diretamente em cada poço. Após breve centrifugação, anticorpo anti-CD154 do tipo selvagem

20 biotinilado (por exemplo, um anticorpo IgG1) em tampão de ensaio 1x é adicionado a cada poço até uma concentração final de 5 nM. Cem μ g/ml de glóbulos receptores de anti-GST são adicionados a cada poço, e a placa é incubada no escuro por 1 hora em temperatura ambiente. Cem μ g/ml de glóbulos doadores de estreptavidina são adicionados a cada placa e, após

25 breve centrifugação, a placa é incubada em temperatura ambiente por 1,5 hora. As amostras de reação são transferidas para placas opacas brancas, e a fluorescência é lida em uma leitora de microplacas Fusion® Alpha-FP HT (Perkin Elmer). Os dados podem ser normalizados para o maior sinal (sem competição) e ajustados para um modelo de competição por um sítio usando

30 uma regressão não linear com o software GraphPad Prism (GraphPad Software), por exemplo.

Aqueles versados na técnica podem realizar os ensaios acima

ou ensaios similares para medir a ligação de variantes de anticorpo a qualquer FcR, incluindo, por exemplo, FcγRIIIa.

Ensaio de ligação de C1q

O ensaio de ligação de C1q pode ser realizado por revestimento das placas de ELISA de 96 poços Maxisorb (Nalge-Nunc Rochester, NY, EUA) com 50 µl de ligante de CD154 solúvel humano recombinante (Karpusas e outros *Structure*, 15; 3 (12): 1.426 (1995) a 10 µg/ml de um dia para o outro a 4°C em PBS. Os poços são aspirados e lavados três vezes com tampão de lavagem (PBS, Tween 20 0,05%) e bloqueados por pelo menos 1 hora com 200 µl/poço de tampão de bloqueio/diluyente (Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 7,0, NaCl 1 M, Tween 20 0,05%, gelatina 0,1%). O anticorpo a ser testado é diluído em tampão de bloqueio/diluyente começando a 15 µg/ml com diluições de 3 vezes. Cinquenta µl são adicionados por poço, e as placas são incubadas por 2 horas em temperatura ambiente.

Após aspiração e lavagem como acima, 50 µl/poço de 2 µg/ml de C1q humana Sigma (C0660) diluídos em tampão de bloqueio/diluyente são adicionados e incubados por 1,5 hora em temperatura ambiente. Após aspiração e lavagem como acima, 50 µl/poço de anti-C1q de carneiro (Serotec AHP033), diluídos 3.560 vezes em tampão de bloqueio/diluyente, são adicionados. Após incubação por 1 hora em temperatura ambiente, os poços são aspirados e lavados como acima. Cinquenta µl/poço de anticorpo de macaco de anti-IgG de carneiro conjugado à HRP (Jackson ImmunoResearch 713-035-147) diluídos até 1:10.000 em tampão de bloqueio/diluyente são então adicionados, e os poços são incubados por 1 hora em temperatura ambiente.

Após aspiração e lavagem como acima, 100 µl de substrato de TMB (420 µM de TMB, H₂O₂ 0,004% em tampão de acetato de sódio 0,1 M/ácido cítrico, pH 4,9) são adicionados e incubados por 2 minutos, antes de a reação ser interrompida com 100 µl de ácido sulfúrico 12 N. A absorbância é lida a 450 nm com um instrumento Softmax PRO, e o software Softmax é usado para determinar a afinidade de ligação relativa (valor C) com um ajuste de 4 parâmetros.

Um ensaio de ligação de C1q alternativo utiliza ELISA para de-

terminar a ligação de anti-CD154 ao C1q, mas não usa CD154 como uma ponte. Resumidamente, as placas de ensaio podem ser revestidas de um dia para o outro a 4°C com um anticorpo variante ou um anticorpo parente (controle) em tampão de revestimento. As placas podem então ser lavadas e
5 bloqueadas. Após a lavagem, uma alíquota de C1q humano pode ser adicionada a cada poço e incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após uma lavagem adicional, 100 µl de um anticorpo de carneiro anti-C1q do complemento conjugado à peroxidase podem ser adicionados a cada poço e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. A placa pode ser novamente
10 lavada com tampão de lavagem, e 100 µl de tampão de substrato contendo OPD (dicloridrato de O-fenilenediamina (Sigma)) podem ser adicionados a cada poço. A reação de oxidação, observada pelo surgimento de uma cor amarela, evolui por 30 minutos e é interrompida pela adição de 100 µl de H₂SO₄ 4,5 N. A absorbância pode então ser lida a (492-405) nm.

15 Um anticorpo variante exemplar é aquele que exibe uma "redução significativa da ligação de C1q" neste ensaio. Uma redução significativa pode ser, em algumas modalidades, cerca de 100 µg/ml do anticorpo variante exibirem uma redução de 50 vezes ou mais na ligação de C1q, comparados com 100 µg/ml de um anticorpo de controle que possui uma região Fc de IgG1 não mutada. Na modalidade mais preferida, o polipeptídeo (isto é, o
20 anticorpo) variante não se liga ao C1q, isto é, 100 µg/ml do variante de anticorpo exibem uma redução de cerca de 100 vezes ou mais na ligação de C1q, comparados com 100 µg/ml do anticorpo de controle.

Ativação de complemento e CDC

25 Para avaliar a ativação do complemento, pode ser realizado um ensaio de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), por exemplo, como descrito em Gazzano-Santoro e outros, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). Resumidamente, várias concentrações do polipeptídeo (isto é, anticorpo) variante e de complemento humano podem ser diluídas com tampão.
30 As células que expressam o antígeno ao qual o polipeptídeo variante se liga podem ser diluídas até uma densidade de cerca de 1 X 10⁶ células/ml. Misturas de polipeptídeo variante, complemento humano diluído e células que

expressam o antígeno podem ser adicionadas a uma placa de cultura de tecido de 96 poços de fundo chato e permanecem em incubação por 2 horas a 37°C e CO₂ 5% para facilitar a lise de complemento mediada por células. Cinquenta µl de azul alamar (Accumed International) podem então ser adi-
5 cionados a cada poço e incubados de um dia para o outro a 37°C. A absor-
bância é medida usando um fluorômetro de 96 poços com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm. Os resultados podem ser expressos em unidades de fluorescência relativa (RFU). As concentrações da amostra podem ser computadas por uma curva-padrão e o percentual de atividade comparado
10 com polipeptídeo não-variante é registrado para o polipeptídeo variante de interesse.

EXEMPLO 13: MAPEAMENTO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO ANTICORPO 342 NA PROTEÍNA CD154

Foram feitos experimentos para identificar os resíduos de ami-
15 noácidos no CD154 humano que são importantes na ligação de 342 com o uso de CD154 proteínas quiméricas humanas-de camundongo. O anticorpo 342 se liga com alta afinidade ao CD154 humano, mas não se liga ao CD154 de camundongo. Portanto, por mutação dos resíduos de CD154 camundon-
go para aqueles dos resíduos humanos correspondentes e medindo-se a
20 mudança na afinidade da proteína mutada para 342, podem ser identificados importantes resíduos de ligação. Foram selecionados seis grupos de mutan-
tes nos quais resíduos humanos em regiões selecionadas foram introduzidos no CD154 solúvel de camundongo (marcados em 1-6 na Figura 28). Proteí-
nas não mutadas de CD154 solúvel humano e de camundongo (sCD154)
25 também foram avaliadas. As diferentes proteínas sCD154 foram usadas em experimentos Biacore® usando o anticorpo 342 (em um formato de IgG) i-
mobilizado no chip e com os sobrenadantes de sCD154 na fase de solução. Os resultados demonstraram que a ligação de 342 só ocorre com a introdu-
ção de resíduos humanos do Grupo 5 em CD154 de camundongo.

EXEMPLO 14: ENSAIO DE BLOQUEIO CRUZADO COM ELISA DE COM- 30 PETIÇÃO

Para demonstrar o bloqueio cruzado de Fab' de 342 e 5c8, utili-

zou-se um ELISA de competição. Neste ensaio, o anticorpo anti-Myc 9E10 foi revestido em uma placa de ELISA. CD154 marcado com Myc foi capturado por esse anticorpo. Uma série de diluições de Fab' não marcado de 342 ou 5c8 foi incubada com Fab' de 342 com biotina 1 nM ou 5c8 com biotina 0,3 nM na placa por duas horas em temperatura ambiente em PBS, Tween 20 0,05%, BSA 1%. A placa foi lavada e a quantidade de Fab de 5c8 biotinilado ligado foi determinada usando estreptavidina HRP como um secundário. O sinal foi colocado em um gráfico e ajustado usando uma curva hiperbólica de ligação de um sítio ou uma curva hiperbólica de ligação de dois sítios ajustada no software Prism (Graph Pad).

Foi realizada uma titulação de Fab' de 342 biotina em CD154 para determinar a concentração adequada para a análise do bloqueio cruzado (Figura 29A). Verificou-se que uma concentração de 1 nM estava na parte linear da curva. Também foi feita uma titulação de Fab' de 5c8 biotina em CD154 para determinar a concentração adequada para a análise do bloqueio cruzado (Figura 29B). Verificou-se que uma concentração de 0,3 nM estava na parte linear da curva. Em um experimento para analisar o bloqueio cruzado de Fab's de 342 biotina e 5c8 biotina por Fab' de 342 não marcado, Fab' de 342 inibiu a ligação de Fab' de 342 biotina com uma afinidade de 0,09 nM (Figura 29C). Fab' de 342 inibe a ligação de 5c8 biotina com duas afinidades, 0,134 nM e 76 nM (Figura 29C). O bloqueio cruzado de 342 biotina por Fab' de 5c8 não marcado é mostrado na Figura 29D. A concentração máxima de Fab' de 5c8 nessa curva, 50 nM, está bem acima do ponto de saturação para 5c8 e também está bem acima da concentração de 1 nM de 342 biotina. A ausência de inibição completa nessas concentrações sugere que 5c8 é incapaz de bloquear completamente todos os sítios de ligação de 342 em CD40L.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação de CD154, caracterizada pelo fato de que compreende sequências de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 selecionadas de:

5 a) SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:5, respectivamente;

b) SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 e SEQ ID NO:44, respectivamente; e

10 c) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 e SEQ ID NO:50, respectivamente;

ou compreendendo sequências da cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 selecionadas de:

a) SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:8, respectivamente;

15 b) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46 e SEQ ID NO:47, respectivamente; e

c) SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:53, respectivamente.

20 2. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende sequências de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 e cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 selecionadas de:

a) SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 , SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:8, respectivamente;

25 b) SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 , SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46 e SEQ ID NO:47, respectivamente; e

c) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 , SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:53, respectivamente.

3. Proteína de ligação de CD154, caracterizada pelo fato de que compreende:

30 a) uma sequência domínio V_H selecionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60 e uma sequência de aminoácido compreendendo

um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a qualquer uma das SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60; ou

5 b) sequência de domínio V_L selecionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58 e uma sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a qualquer uma das SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58.

10 4. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que compreende sequências de domínio V_H e V_L selecionadas de:

15 a) SEQ ID NO: 1 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 2, respectivamente;

20 b) SEQ ID NO: 11 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 2 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 2, respectivamente;

25 c) SEQ ID NO: 9 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 14 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 14, respectivamente;

30 d) SEQ ID NO: 10 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 14 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 14, respectivamente;

e) SEQ ID NO: 29 ou sequência de aminoácido compreendendo

um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 30, respectivamente;

5 f) SEQ ID NO: 56 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 54 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 54, respectivamente; e

10 g) SEQ ID NO: 60 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 60 e SEQ ID NO: 58 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 58, respectivamente.

15 5. Proteína de ligação de CD154, caracterizada pelo fato de que compreende

a) uma sequência da cadeia pesada selecionada de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 72 e sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a qualquer uma das SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 72; ou

b) uma sequência da cadeia leve selecionada de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 69 e sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 15, ou SEQ ID NO: 69.

25 6. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que compreende sequências de cadeias pesadas e leves selecionadas de:

a) SEQ ID NO: 12 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO 15 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ

ID NO: 15, respectivamente.

b) SEQ ID NO: 13 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO 15 ou sequência de aminoácido compreendendo
5 um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 15, respectivamente e,

c) SEQ ID NO: 72 ou sequência de aminoácido compreendendo um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 72 e SEQ ID NO 69 ou sequência de aminoácido compreendendo
10 um ou mais substituto conservativo que é pelo menos 90% idêntico a SEQ ID NO: 69, respectivamente.

7. Proteína de ligação de CD154 de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 6, caracterizada pelo fato de que o substituto conservativo não está dentro das CDRs.

15 8. Proteína de ligação de CD154, caracterizada pelo fato de que compreende sequências de cadeia pesada e leve de SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 15, respectivamente.

9. Proteína de ligação de CD154 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação
20 ção é um anticorpo anti-CD154 ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo.

10. Anticorpo anti-CD154 de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado de um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo sensibilizado e um anticorpo
25 humanizado.

11. Anticorpo anti-CD154 de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado de um anticorpo multimérico, um anticorpo heterodimérico, um anticorpo hemidimérico, um anticorpo tetravalente, um anticorpo biespecífico e um anticorpo de cadeia única;
30 e derivados dos mesmos.

12. Fragmento de ligação de antígeno como definido na reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o fragmento é selecionado de Fab,

F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd, Fv e domínio anticorpo.

13. Anticorpo anti-CD154 ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, caracterizado pelo fato de que é modificado por uma ligação covalente ou uma porção funcional.

14. Anticorpo anti-CD154 ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a porção funcional é polietileno glicol ou um derivado de mesmo.

15. Anticorpo anti-CD154 ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação de antígeno é um Fab' em que um grupo tiol em uma região de dobradiça modificada é covalentemente ligado a um grupo maleimida que é covalentemente ligado a um resíduo de lisina, em que um polímero de metoxipoli(etilenoglicol) tendo um peso molecular de aproximadamente 20.000 Da é ligado a cada grupo amino da lisina.

16. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende um domínio de estrutura de uma proteína não-imunoglobulina

17. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação é desprovida de uma região Fc imunoglobulina.

18. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende uma região Fc imunoglobulina selecionada de regiões Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, ou derivada de regiões Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

19. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação ainda compreende uma região Fc variante que confere função efetora reduzida comparada com uma região Fc nativa ou parental.

20. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a região Fc variante é uma região Fc híbrida que compreende sequências de mais de um tipo de domínio

Fc de Ig.

21. Proteína de ligação de CD154 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação não é glicosilada.

5 22. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizada pelo fato de que a função efetora reduzida é ligação reduzida a um receptor Fc (FcR).

10 23. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizada pelo fato de que a função efetora reduzida é ligação reduzida a uma proteína do complemento.

24. Proteína de ligação de CD154, anticorpo anti-CD154 ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação, anticorpo ou fragmento está ligado a uma porção funcional.

15 25. Proteína de ligação de CD154 que se liga ao mesmo epitopo de CD154 humano como uma proteína de ligação, caracterizada pelo fato de que compreende

(a) uma sequência domínio V_H da SEQ ID NO: 1 e uma sequência domínio V_L da SEQ ID NO: 2;

20 (b) uma sequência domínio V_H da SEQ ID NO: 56 e uma sequência domínio V_L da SEQ ID NO: 54; ou

(c) uma sequência domínio V_H da SEQ ID NO: 60 e uma sequência domínio V_L da SEQ ID NO: 58; e

25 em que, quando a proteína de ligação de CD154 está presente em condições de saturação ou acima delas para ligação de CD154 humano com base em sua afinidade de ligação,

30 a proteína de ligação CD154 bloqueia a ligação do anticorpo monoclonal 5c8 (Nº de Acesso na ATCC HB 10916) ao CD154 quando adicionada ao CD154 humano primeiro, e desloca o anticorpo monoclonal 5c8 (Nº de Acesso na ATCC HB 10916) ligado ao CD154 humano quando adicionada depois do anticorpo monoclonal 5c8 (Nº de Acesso na ATCC HB 10916) ser adicionado;

e em que a proteína de ligação não é um anticorpo monoclonal 5c8 (Nº de Acesso na ATCC HB 10916).

26. Proteína de ligação de CD154 de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que possui pelo menos uma das seguintes propriedades:

5 (a) liga-se ao CD154 humano com uma afinidade de $K_d = 50$ pM ou uma maior afinidade como determinada por ressonância de plasmônio usando a proteína de ligação CD154 como o ligante e o domínio extracelular do CD154 como o analito;

10 (b) possui um IC50 de 35 ng/mL ou menos como determinado através de sua habilidade de inibir a ligação do CD40 ao CD154 expressando as células Jurkat D1.1;

(c) possui um IC50 de 192 ng/mL ou menos como determinado através de sua habilidade de inibir CD40-CD154 mediada por suprarregulação do ICAM-1 expressa na superfície de células B;

15 (d) causa menor agregação de plaquetas em comparação com anticorpo monoclonal 5c8 (Nº de Acesso na ATCC HB 10916) ou humanizado 5c8; e

(e) possui função efetora reduzida comparada com 5c8 (Nº de Acesso na ATCC HB 10916) ou humanizado 5c8;

em que a proteína de ligação não é anticorpo monoclonal 5c8 (Nº de Acesso na ATCC HB 10916).

27. Molécula de ácido nucléico, caracterizada pelo fato de que codifica a proteína de ligação de CD154, o anticorpo anti-CD154 ou o fragmento de ligação de antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26.

28. Molécula de DNA, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência selecionada de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID

NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 73 ou compreende uma sequência selecionada de uma sequência pelo menos 90% idêntica a, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24,
5 SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 70 ou SEQ ID NO: 73.

29. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucléico como definida na reivindicação 27 ou a molécula de DNA como definida na reivindicação 28.
10

30. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de compreender o vetor como definido na reivindicação 29.

31. Método para a produção de uma proteína de ligação de CD154, caracterizado pelo fato de que compreende
15

(a) cultivo de uma célula hospedeira como definida na reivindicação 30, sob condições adequadas à expressão da proteína de ligação de CD154 pela célula hospedeira; e

(b) recuperação da proteína de ligação CD154.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula procariótica ou uma célula eucariótica.
20

33. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína de ligação CD154, o anticorpo anti-CD154 ou o fragmento de ligação de antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 e um veículo farmacologicamente aceitável.
25

34. Composição de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um composto ou agente imunossupressor ou imunomodulador adicional.

35. Uso da proteína de ligação CD154, do anticorpo anti-CD154 ou do fragmento de ligação de antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou da composição como definida na reivindicação 33,
30

caracterizado pelo fato de ser no preparo de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição humana, distúrbio ou uma doença mediada no todo ou em parte por sinalização de CD40, ou um sintoma de qualquer um dos citados anteriormente.

5 36. Uso de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a condição, distúrbio ou doença é uma resposta autoimune ou inflamatória ou fibrose.

10 37. Uso de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a resposta autoimune ou inflamatória ou fibrose é selecionada de artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, espondiloartrite, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, psoríase e esclerose múltipla.

FIG. 1

Seqüências de CDR para o anticorpo anti-CD154 342

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº: 3	CDR-H1	GFSSTNYHVH
ID. DE SEQ. Nº: 4	CDR-H2	VIWGDGDTSYNSVLKS
ID. DE SEQ. Nº: 5	CDR-H3	QLTHYYVLAA
ID. DE SEQ. Nº: 6	CDR-L1	RASEDLYYNLA
ID. DE SEQ. Nº: 7	CDR-L2	DTYRLAD
ID. DE SEQ. Nº: 8	CDR-L3	QQYYKFPFT

Seqüências de CDR para o anticorpo anti-CD154 381

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº: 42	CDR-H1	GFTFSDYYMA
ID. DE SEQ. Nº: 43	CDR-H2	SISYEGSSTYYGDSVKG
ID. DE SEQ. Nº: 44	CDR-H3	HDDSPGYFFDY
ID. DE SEQ. Nº: 45	CDR-L1	LAGEDISNVLA
ID. DE SEQ. Nº: 46	CDR-L2	AANRLQD
ID. DE SEQ. Nº: 47	CDR-L3	QQTFRYPLT

Seqüências de CDR para o anticorpo anti-CD154 338

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº: 48	CDR-H1	GFSLTSHHIS
ID. DE SEQ. Nº: 49	CDR-H2	VMWNDGGTLYNSALKS
ID. DE SEQ. Nº: 50	CDR-H3	GKMHYVVLDA
ID. DE SEQ. Nº: 51	CDR-L1	RTSEDIYSNLA
ID. DE SEQ. Nº: 52	CDR-L2	DTNRLAD
ID. DE SEQ. Nº: 53	CDR-L3	QHYSNFPWT

FIG. 2

Seqüências do anticorpo anti-CD154 de rato 342

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº:29 (pesada 342 na Figura 9)	Região VH do Ab de RATO 342	QVQLKESGPGLVQPSETLSLTCTVSGFSSSTNYHVHWVRQPPGKSLEW MGVIWGDGDTSYNSVLKSRLSITRDTSRSQVFLKMSSLQTEDTATYY CARQLTHYYVLAAWGQGASVTVS
ID. DE SEQ. Nº:34	Região VH do Ab de RATO 342 com seqüência sinalizadora	<u>atggctgtcctgggtgctgttgcctctgctgatgacatttccaagctg</u> <u>tgtcctgtcccaggtgcagctgaaggagt caggacctggcctggc</u> agccctcagagacctgtctctcacctgcactgtctctgggttctca tcaaccaattatcatgtgcactgggttcgacagcctccaggaaaaag tcttgagtggatgggagtaatatggggatgatggagacacatcatata attcagttctcaaatcccgactgagcatcaccagggacacctccagg agccaagtttcttaaaaatgagcagctcgaaaacggaggacactgc cacctactattgtgccaggcaattgactcattactatgttctggctg cctgggggtcaaggagcttcagtcactgtctcg
ID. DE SEQ. Nº:32	Região VH do Ab de RATO 342 sem seqüência sinalizadora	cagggtgcagctgaaggagt caggacctggcctgggtgcagccctcaga gacctgtctctcacctgcactgtctctgggttctcatcaaccaatt atcatgtgcactgggttcgacagcctccaggaaaaagtcttgagtgg atgggagtaatatggggatgatggagacacatcatataattcagttct caaatcccgactgagcatcaccagggacacctccaggagccaagtt tcttaaaaatgagcagctcgaaaacggaggacactgccacctactat tgtgccaggcaattgactcattactatgttctggctgcctgggggtca aggagcttcagtcactgtctcg
ID. DE SEQ. Nº:30 (leve 342 na Figura 9)	Região VL do Ab de RATO 342	DIQMTQSPASLSASLGFTVTVVECRASEDLYYNLAWYQRKPGNSPQLL IYDTRYRLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINTLPSGDVASYFCQYYKF PFTFGSGTKLELK
ID. DE SEQ. Nº:33	Região VL do Ab de RATO 342 com seqüência sinalizadora	<u>atgggtgtgccactcatctcctgggggtgttgctactgtggattac</u> <u>agatgccatatgtgacatccagatgacacagctctccagcttcctgt</u> ctgcatctctgggagaaactgtcacctgcgaatgtcgagcaagtgag gaccttactataatttagcgtggatcagcggaaccagggaactc tctcaactcctgatctatgatacatataggttggcagatgggggtcc catcacgggttcagtgccagtggtctggcacacagttctctaaag ataaacacctgccatctggagatgtcgcaagttatttctgtcaaca gtattacaaatttccattcacgttcgggtcagggaccaagctggaac tgaaa
ID. DE SEQ. Nº:31	Região VL do Ab de RATO 342 sem seqüência sinalizadora	gacatccagatgacacagctctccagcttcctgtctgcatctctggg agaaactgtcacctgcgaatgtcgagcaagtgaggaccttactata atttagcgtggatcagcggaaccagggaactctctcaactctctg atctatgatacatataggttggcagatgggggtccatcacgggtcag tggcagtggtctggcacacagttctctaaagataaacacctgc catctggagatgtcgcaagttatttctgtcaacagttattacaaatt ccattcacgttcgggtcagggaccaagctggaactgaaa

FIG. 3

Seqüências da Framework receptora

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº:35 (2 1 1 O12 na Figura 9)	Framework receptora de VK1 2-1-(1) O12 JK1 humano	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIK
ID. DE SEQ. Nº:36	Framework receptora de VK1 2-1-(1) O12 JK1 humano	gacatccagatgacccagtcctccatcctccctgtc tgcattctgtaggagacagatcaccatcacttgcc gggcaagtcagagcatttagcagctatttaaattgg tatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcct gatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcc catcaaggttcagtgccagtggtctgggacagat ttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaaga tttgcaacttactactgtcaacagagttacagta cccttggacggttcggccaagggaccaaggtggaa atcaaa
ID. DE SEQ. Nº:37 (1-1 3-66 na Figura 9)	Framework receptora de VH3 1-1 3-66 Jh4 humano	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQ APGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCARYFDYWGQGLVTVS
ID. DE SEQ. Nº:38	Framework receptora de VH3 1-1 3-66 JH4 humano	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggg ccagcctggggggtccctgagactctcctgtgcag cctctggattcaccgtcagtagcaactacatgagc tgggtccgccaggtccagggaaagggctggagtg ggctcagttatttatagcggtagcactact acgcagactccgtgaagggcagattcaccatctcc agagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaat gaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtatt actgtgcgagatactttgactactggggccagggg accctggtcaccgtctcc
ID. DE SEQ. Nº:39 (1-1 4-59 na Figura 9)	Framework receptora de VH4 1-1 4-59 Jh4 humano	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ PPGKGLEWIGYIYSGSTNYPNPSLRSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARYFDYWGQGLVTVS
ID. DE SEQ. Nº: 40	Framework receptora de VH4 1-1 4-59 JH4 humano	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggg gaagccttcggagaccctgtccctcaccctgcaactg tctctgggtggctccatcagtagttactactggagc tggatccggcagccccagggaaagggactggagtg gattgggtatatttacagtgaggagaccaccaact acaaccctccctcaagagtcgagtcaccatca gtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagct gagctctgtgaccgctgcgacacggcggctgtatt actgtgcgagatactttgactactggggccagggg accctggtcaccgtctcc

FIG. 4

Enxertos de CDR de 342 baseados em frameworks receptoras

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº: 10 (VH3 gH7 na Figura 9)	Enxerto somente da CDR da cadeia pesada CDR baseado na framework receptora de VH3 1-1 3-66 JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSTNYHVHWVRQA PGKGLEWVSVIWDGDTSYNSVLKSRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARQLTHYYVLAAWGQGLVTVS
ID. DE SEQ. Nº: 20	Enxerto somente da CDR da cadeia pesada CDR baseado na framework receptora de Vh3 1-1 3-66 JH4	gaggtgcagctggctcgagctctggaggcgggcttgtccagc ctgggtgggagcctgcgtctctctgtgcagcgagcggctt cagctctaccaattaccatgtgcactgggtgcgtcaggca cctgggaagggcctggagtggtgagtggtatttggggcg acggcgatacatcctacaactccgctcctgaagagccgctt caccatttcccgtagaactcaagaataccctttacctc cagatgaactctctccgcgagaggacacagcagctctatt actgtgcagctcaactgaccactattacgttttggcagc ctggggctcaagggactctggtcacagctctcg
ID. DE SEQ. Nº: 9	Enxerto somente da CDR da cadeia pesada CDR baseado na framework receptora de VH4 1-1 4-59 JH4	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSSTNYHVHWI RQPPGKGLEWIGVIWDGDTSYNSVLKSRVTISVDTIS KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARQLTHYYVLAAWGQG TLVTVS
ID. DE SEQ. Nº: 19	Enxerto somente da CDR da cadeia pesada CDR baseado na framework receptora de VH4 1-1 4-59 JH4	caggtgcagctgcaggagctctggaccggggcttgtca agcctagtgagaccctgagcctcacttgtaccgctgag cggcttcagctctaccaattaccatgtgcactggatt cgtcagccacctgggaagggcctggagtggttgggtg ttatttggggcgacggcgatacatcctacaactccgct cctgaagagccgctgtcaccatttccgctgacacctca aagaatcaatttccctcaagtgagctctgtcaccg cagcggacacagcagctctattactgtgcagctcaact gaccactattacgttttggcagcctggggctcaaggg actctggtcacagctctcg
ID. DE SEQ. Nº: 14 (Vk1 gL3 na Figura 9)	Enxerto somente da CDR da cadeia leve CDR baseado na framework receptora de VK1 2-1-(1) O12 JK	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDLYYNLAWYQ QKPGKAPKLLIYDITYRLADGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQYYKFPFTFGQGTKVEIK
ID. DE SEQ. Nº: 16	Enxerto somente da CDR da cadeia leve CDR baseado na framework receptora de VK1 2-1-(1) O12 JK1	gatatccagatgaccagagtccaagcagctctctccg ccagcgtaggcgatcgtgtgactattacctgtcgtgc cagtgaggacctctattacaacctggcctggatcag caaaaaccgggcaagccccgaagctgctcatctatg atacgtaccgctggctgacgggtgtgccaagccgctt cagtgccagtgccagcggactgactttaccctcaca atttcgtctctccagccggaagatttcgccacttact attgtcagcaatattacaagttccctttcaccttcgg tcagggcactaaagtagaatcaaa

FIG. 5

gH1 de 342 baseada em frameworks receptoras

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº: 1 (VH3 gH1 na Figura 9)	gH1 baseado na framework receptora de VH3 1-1 3-66 JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSSTNYHV HWVRQAPGKGLEWMGVIWGDGDTSYNSVLKSRFT ISRDTSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARQLTHY YVLAAWGQGLVTVS
ID. DE SEQ. Nº: 22	gH1 baseado na framework receptora de VH3 1-1 3-66 JH4	gaggtgcagctggtcgagctggaggcgggcttgtcc agcctggtgggagcctgegtctctcttgtgcagtgag cggcttcagctctaccaattaccatgtgcactgggtg cgtcaggcacctgggaagggcctggagtggatgggtg ttattggggcgacggcgatacatcctacaactcct cctgaagagccgtttcaccatttcccgtgacacctca aagaataccgtttacctccagatgaactctctccgcg cagaggacacagcagctctattactgtgcagctcaact gaccactattacgtttggcagcctgggggtcaaggg actctggtcacagtctcg
ID. DE SEQ. Nº: 11 (VH4 gH1 na Figura 9)	gH1 baseado na framework receptora de VH4 1-1 4-59 JH4	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSSTNYHV HWIRQPPGKGLEWMGVIWGDGDTSYNSVLKSRVT ISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARQLTHY YVLAAWGQGLVTVS
ID. DE SEQ. Nº: 21	gH1 baseado na framework receptora de VH4 1-1 4-59 JH4	caggtgcagctgcaggagtctggaccggggcttg tcaagcctagtgcagaccctgagcctcacttgtac cgtgagcggcttcagctctaccaattaccatgtg cactggattcgtcagccacctgggaagggcctgg agtggatgggtgttatttggggcgacggcgatac atcctacaactcctcctgaagagccgtgtcacc atctcccgtgacacctcaaagaatcaagtttccc tcaagttgagctctgtcaccgcagcggacacagc agtctattactgtgcagctcaactgaccactat tacgttttggcagcctgggggtcaagggactctgg tcacagtctcg

FIG. 6

342 gL4

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº: 2 (VK1 gL4 na Figura 9)	Leve variável de gL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDLYYNLA WYQRKPGKAPKLLIYDTRYLADGVPSRFSGSGS TDYTLTISSLQPEDFASYCQYYKFPFTFGQGT KVEIK
ID. DE SEQ. Nº: 17	Leve variável de gL4	gatataccagatgaccagagtccaagcagtcctc ccgccagcgtaggcgatcgtgtgactattacctg tcgtgccagtgaggacctctattacaacctggcc tggatcagcgtaaaccgggcaaagccccgaagc tgctcatctatgatacgtaccgcctggctgacgg tgtgccaagccgtttcagtgccagtgccagcggg actgactataacctcacaatttcgtctctccagc cggagatttcgctcttactattgtcagcaata ttacaagttccctttcaccttcggtcagggcact aaagtagaatcaaa
ID. DE SEQ. Nº: 25	gL4 Seqüência da leve variável com a seqüência que codifica o peptídeo sinalizador sublinhada	<u>atgaaaagacagctatcgcaattgcagtgccct</u> <u>tggctggtttcgctaccgtagcgcaagctgat</u> ccagatgaccagagtccaagcagtcctcctccgc agcgtaggcgatcgtgtgactattacctgtcgtg ccagtgaggacctctattacaacctggcctggta tcagcgtaaaccgggcaaagccccgaagctgctc atctatgatacgtaccgcctggctgacgggtgtgc caagccgtttcagtgccagtgccagcgggactga ctataacctcacaatttcgtctctccagccggaa gatttcgctcttactattgtcagcaatattaca agttccctttcaccttcggtcagggcactaaagt agaaatcaaa

FIG. 7

Seqüências de 342

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº: 15	Cadeia leve de 342gL4 (incluindo a região constante)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDLYYNLAWYQ RKPGKAPKLLIYDYLADGVPSRFGSGSGTDYTLT ISSLQPEDFASYCQYYKFPFTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ID. DE SEQ. Nº: 18	Cadeia leve de 342gL4 (incluindo a região constante)	<u>atgaaaaagacagctatcgcaattgcagtgcccttggctg</u> <u>gtttcgctaccgttagcgcaagctgatatccagatgacca</u> gagtccaagcagctctctccgccagcgtaggcgatcgtgtg actattacctgtcgtgccagtgaggacctctattacaacc tggcctggtatcagcgtaaaccgggcaaagccccgaagct gctcatctatgatcagcgtaccgctggctgacgggtgtgcca agccgtttcagtgccagtgccagcggtactgactataccc tcacaatttcgctctctccagccggaagatttcgctctta ctattgtcagcaatattacaagttccctttcaccttcggt cagggcactaaagtagaaatcaaacgtacggtagcggccc catctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaa atctggaactgcctctgttgtgtgacctgctgaataacttc tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacg ccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagca ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctg acgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacg cctgcgaagtcaaccatcagggcctgagctcaccagtaac aaaaagttttaatagaggggagtg
ID. DE SEQ. Nº: 12	Cadeia pesada de Fab de 342gH1 (sem dobradiça) (incluindo região constante)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSSTNYHVHWV RQAPGKGLEWMGVIWGDGDTSYNSVLKSRFTISRDT KNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLTHYYVLAAWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

FIG. 7 (continuação)

Número do identificador de seqüência	Descrição	Seqüência
ID. DE SEQ. Nº: 26 (ID. DE SEQ. Nº: 23 sem seqüência sinalizadora)	Cadeia pesada do Fab de 342gH1 (sem dobradiça) (incluindo região constante)	<p>atgaagaagactgctatagcaattgcagtgccgctagctgggt tccgccaccgtggcgcaagctgaggttcagctggcgcagctct ggaggcgggcttgtccagcctgggtgggagcctgctctctct tgtgcagtgagcggttcagctctaccaattaccatgtgcac tgggtgctgcagggcacctgggaagggcctggagtggatgggt gttatttggggcgacggcgatacatcctacaactccgtcctg aagagccgtttcaccatttcccgtgacacctcaaagaatacc gtttacctccagatgaactctctccgcgcagaggacacagca gtctattactgtgcagctcaactgaccactattacgttttg gcagcctggggtcaagggactctgggtcacagctctgcagcgt tctacaaagggccatcggtcttccccctggcaccctcctcc aagagcacctctggggggcacagcggccctgggctgctggct aaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactca ggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtg ccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg aatcacaagcccagcaacaccaaggtcgacaagaaagttag cccaaatcttgt</p>
ID. DE SEQ. Nº: 13	Cadeia pesada de Fab' de 342gH1 (incluindo região constante)	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSFGFSSTNYHVVHWVRQ APGKGLEWMGVIWGDGDTSYNSVLKSRFTISRDTSKNTV YLQMNLSRAEDTAVYYCARQLTHYYVLAAWQDGLTVTVS SASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCAA</p>
ID. DE SEQ. Nº: 27 (ID. DE SEQ. Nº: 24 sem seqüência sinalizadora)	Cadeia pesada de Fab' de 342gH1 (incluindo região constante)	<p>atgaagaagactgctatagcaattgcagtgccgctagctgggt tccgccaccgtggcgcaagctgaggttcagctggcgcagctct ggaggcgggcttgtccagcctgggtgggagcctgctctctct tgtgcagtgagcggttcagctctaccaattaccatgtgcac tgggtgctgcagggcacctgggaagggcctggagtggatgggt gttatttggggcgacggcgatacatcctacaactccgtcctg aagagccgtttcaccatttcccgtgacacctcaaagaatacc gtttacctccagatgaactctctccgcgcagaggacacagca gtctattactgtgcagctcaactgaccactattacgttttg gcagcctggggtcaagggactctgggtcacagctctgcagcgt tctacaaagggccatcggtcttccccctggcaccctcctcc aagagcacctctggggggcacagcggccctgggctgctggct aaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactca ggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtg ccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg aatcacaagcccagcaacaccaaggtcgacaagaaagttag cccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccggcg</p>

FIG. 8

ID. DE SEQ. Nº: 28: seqüência do DNA do vetor
de Fab de 342gL4gH1 (sem dobradiça)

```

1  atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac
51  cgtagcgcaa gctGATATCc agatgacca gagtccaagc agtctctccg
101 ccagcgtagg cgatcgtgtg actattacct gtcgtgccag tgaggacctc
151 tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa ccgggcaaag ccccgaaagct
201 gtcctatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgtgcca agccgtttca
251 gtggcagtggt cagcggctact gactataccc tcacaatttc gtctctccag
301 ccggaagatt tcgcctctta ctattgtcag caatattaca agttcccttt
351 caccttcggt cagggcacta aagtagaaat caaaCGTACG gtagcggccc
401 catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact
451 gcctctgttg tgtgcctget gaataacttc tatcccagag aggccaaagt
501 acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc caggagagtg
551 tcacagagca ggacagcaag gacagacct acagcctcag cagcacctg
601 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg atctgcaagt
651 cacccatcag ggcctgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg
701 agtgttaaaa tgaagaagac tgctatagca attgcagtggt cgctagctgg
751 tttcgccacc gtggcgcaag ctgaggttCA GCTGgtcgag tctggaggcg
801 ggcttgtcca gcctggggtg agcctgcgtc tctcttgtgc agtgagcggc
851 ttcagctcta ccaattacca tgtgcaactg gtgcgtcagg cacctgggaa
901 gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatctaca
951 actcgtcct gaagagccgt ttcaccattt cccgtgacac ctcaaagaat
1001 accgtttacc tccagatgaa ctctctccgc gcagaggaca cagcagtcta
1051 ttactgtgca cgtcaactga cccactatta cgttttggca gcctggggtc
1101 aagggactct ggtcacagtC TCGAGcgctt ctacaaaggg cccatcggtc
1151 tccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct
1201 gggtgcctg gteaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga
1251 actcaggegc cctgaccage ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
1301 tctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
1351 cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
1401 ccaaggtcga caagaaagt gagcccaaat cttgttaa

```

FIG. 8 (continuação)

ID. DE SEQ. Nº: 41: seqüência do DNA do vetor de Fab' de 342gL4gH1

```

1   atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac
51  cgtagcgcaa gctGATATCc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg
101 ccagcgtagg cgatcgtgtg actattacct gtcgtgccag tgaggacctc
151 tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa ccgggcaaag ccccgaaagct
201 gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgtgcca agccgtttca
251 gtggcagtggt cagcgggtact gactataccc tcacaatttc gtctctccag
301 ccggaagatt tcgcctctta ctattgtcag caatattaca agttcccttt
351 caccttcggt cagggcacta aagtagaaat caaaCGTACG gtagcggccc
401 catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact
451 gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt
501 acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg
551 tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg
601 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt
651 cacccatcag ggctgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg
701 agtgttaaaa tgaagaagac tgctatagca attgcagtggt cgctagctgg
751 tttcgccacc gtggcgcaag ctgaggttCA GCTGgtcagag tctggaggcg
801 ggcttgtcca gcctgggtggg agcctgcgtc tctcttgtgc agtgagcggc
851 ttcagctcta ccaattacca tgtgcactgg gtgcgtcagg cacctgggaa
901 gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatcctaca
951 actccgtcct gaagagccgt ttcaccattt cccgtgacac ctcaaagaat
1001 accgtttacc tccagatgaa ctctctccgc gcagaggaca cagcagtcta
1051 ttactgtgca cgtcaactga cccactatta cgttttggca gcctggggtc
1101 aagggactct ggtcacagtC TCGAGcgtt ctacaaaggg cccatcggtc
1151 tteccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cageggccct
1201 gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga
1251 actcaggegc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
1301 tctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc ectccagcag
1351 cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
1401 ccaaggtega caagaaagtt gagcccaat cttgtgacaa aactcacaca
1451 tgcgccgcg

```

FIG. 9

Enxertos de CADEIA LEVE 342

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105
 leve 342 DIQMTQSPASLSASVGDRTVITCRASEDL¹YNLAWYQKPGKAPKLLIYD²YRLADGVPSRFSGSGGTD³FILTISSLOPEDFATY⁴COQYKFP⁵FFFGQTKVEIK
 2 1 1 012 DIQMTQSPSLSASVGDRTVITCRASQ¹SISSYLANWYQKPGKAPKLLIY²ASSLQSGVPSRFSGSGGTD³FILTISSLOPEDFATY⁴COQSYSTP⁵FWFGQTKVEIK

VK1 gL3 DIQMTQSPSLSASVGDRTVITCRASEDI¹YNLAWYQKPGKAPKLLIYD²YRLADGVPSRFSGSGGTD³FILTISSLOPEDFATY⁴COQYKFP⁵FFFGQTKVEIK
 VK1 gL4 DIQMTQSPSLSASVGDRTVITCRASEDL¹YNLAWYQKPGKAPKLLIYD²YRLADGVPSRFSGSGGTD³FILTISSLOPEDFATY⁴COQYKFP⁵FFFGQTKVEIK

Enxertos de CADEIA PESADA VH3 342

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 abc 85 90 95 105 110
 pesada 342 QVQLKESGGLVQ¹PGSETLSLCTVSG²FSSTNYHVHWV³VRQPPGKLEWGV⁴IWGDGDTSYNSVLKSR⁵LSTRDTSR⁶SOVFLK⁷WSSIQ⁸TE⁹TATY¹⁰YCAR¹¹QLTH¹²HYVLA¹³AWCGGASVTVS
 1-1-3-66 EVQLVESGGGLVQ¹PGSLRLS²CAASG³FTVSSNT⁴MSWVRQAPGKLEWV⁵SVIYSGS⁶TYAD⁷SVKGR⁸FTISR⁹DNSK¹⁰NLYLQ¹¹MNSL¹²RAED¹³TAVY¹⁴YCAR¹⁵ YFDYWGCGGLVTVS

VH3 gH7 EVQLVESGGGLVQ¹PGSLRLS²CAASG³FSSTNYHVHWV⁴VRQAPGKLEWV⁵VIWGDGDTSYNSVLKSR⁶FTISR⁷DNSK⁸NLYLQ⁹MNSL¹⁰RAED¹¹TAVY¹²YCAR¹³QLTH¹⁴HYVLA¹⁵AWCGGGLVTVS
 VH3 gH1 EVQLVESGGGLVQ¹PGSLRLS²CAVSG³FSSTNYHVHWV⁴VRQAPGKLEWGV⁵IWGDGDTSYNSVLKSR⁶FTISR⁷DTSK⁸NLYLQ⁹MNSL¹⁰RAED¹¹TAVY¹²YCAR¹³QLTH¹⁴HYVLA¹⁵AWCGGGLVTVS

Enxertos de CADEIA PESADA VH4 342

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 abc 85 90 95 105 110
 pesada 342 QVQLKESGGLVQ¹PGSETLSLCTVSG²FSSTNYHVHWV³VRQPPGKLEWGV⁴IWGDGDTSYNSVLKSR⁵LSTRDTSR⁶SOVFLK⁷WSSIQ⁸TE⁹TATY¹⁰YCAR¹¹QLTH¹²HYVLA¹³AWCGGASVTVS
 1-1 4-59 QVQLQESGGGLVQ¹PKFSETLSLCTVSG²SISSYX³SWIRQPPGKLEW⁴IGYIYSGS⁵TNYP⁶SLKSR⁷VTVIS⁸VDTSK⁹QFSLK¹⁰LSV¹¹TAAD¹²TAVY¹³YCAR¹⁴ YFDYWGCGGLVTVS

VH4 gH6 EVQLQESGGGLVQ¹PKFSETLSLCTVSG²FSSTNYHVHWV³IRQPPGKLEW⁴IGVIWGDGDTSYNSVLKSR⁵VTVIS⁶VDTSK⁷KNQ⁸FSLK⁹LSV¹⁰TAAD¹¹TAVY¹²YCAR¹³QLTH¹⁴HYVLA¹⁵AWCGGGLVTVS
 VH4 gH1 EVQLQESGGGLVQ¹PKFSETLSLCTVSG²FSSTNYHVHWV³IRQPPGKLEW⁴IGVIWGDGDTSYNSVLKSR⁵VTVIS⁶EDTSK⁷KNQ⁸VSLK⁹LSV¹⁰TAAD¹¹TAVY¹²YCAR¹³QLTH¹⁴HYVLA¹⁵AWCGGGLVTVS

FIG. 10

Anticorpo anti-CD154 381

Seqüência V_L

ID. DE SEQ. Nº: 54 (a seqüência sublinhada é uma seqüência de CDR)

DIQMTQSPTS LSASLGETVS IECLAGEDIS NVLAWYQQKS GGSPQLLIYA
ANRLQDGVPS RFSGSGSGTR YSLKISGMRP EDEADYFCQQ TFRYPLTFGS
 GTKLELK

ID. DE SEQ. Nº: 55

GACATCCAGA TGACACAGTC TCCAACCTCC CTGTCTGCAT CTCTCGGAGA
 AACTGTCTCC ATCGAATGTC TAGCAGGTGA AGACATTTCC AATGTTTTAG
 CGTGGTATCA GCAGAAGTCA GGGGGGTCTC CTCAGCTCCT GATCTATGCT
 GCAAATAGGT TACAAGACGG GGTCCCCTCA CGGTTTCAGTG GCAGTGGATC
 TGGCACACGG TATTCTCTCA AGATCAGTGG CATGCGACCT GAAGATGAAG
 CAGATTATTT CTGTCAACAG ACTTTCAGGT ATCCGCTCAC GTTCGGTTCT
 GGGACCAAGC TGAATTGAA A

Seqüência V_H

ID. DE SEQ. Nº: 56 (a seqüência sublinhada é uma seqüência de CDR)

EVPLVESGGG LVQPGRSMKL SCVASGFTFS DYYMAWVROA PKKGLEWVAS
ISYEGSSTYY GDSVKGRFTV SRDIAKSTLY LQMHLKSED TAIYYCARHD
DSPGYFDYW GQGVMVTVS

ID. DE SEQ. Nº: 57

GAGGTGCCGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTAGTGCAGC CTGGAAGGTC
 CATGAAACTT TCCTGTGTAG CCTCAGGATT CACTTTCAGT GACTATTACA
 TGGCCTGGGT CCGCCAGGCT CCAAAGAAGG GTCTGGAGTG GGTCCGCATCC
 ATTAGTTATG AGGGTAGTAG TACTTACTAT GGAGACTCCG TGAAGGGCCG
 ATTCACTGTC TCCAGAGATA TTGCAAAAAG CACCCTATAC CTTCAAATGC
 ACAGTCTGAA GTCTGAGGAT ACGGCCATTT ATTATTGTGC ACGACATGAC
 GATAGTCCAG GATACTACTT TGATTATTGG GGCCAAGGAG TCATGGTCCAC
 AGTCTCG

FIG. 11

Anticorpo anti-CD154 338

Seqüência V_L

ID. DE SEQ. Nº: 58 (a seqüência sublinhada é uma seqüência de CDR)
 DIQMTQSPAS LSASLGETVT IECRTSEDIY SNLAWYRQRP GKSPQLLIYD
TNRLADGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLQS EDVASYFCQH YSNFPWTFGG
 DTKLELK

ID. DE SEQ. Nº: 59

GACATCCAGA TGACACAGTC TCCGGCTTCC CTGTCTGCAT CTCTGGGAGA
 AACTGTCACC ATCGAATGTC GAACAAGTGA GGACATTTAC AGTAATTTAG
 CGTGGTATCG GCAGAGACCA GGAAGTCTC CTCAGCTCCT GATCTATGAT
 ACAAATAGAT TGGCTGATGG GGTCCCGTCA CGGTTTCAGTG GCAGTGGATC
 TGGCACACAA TATTCTCTAA AGATAAACAG CCTGCAATCT GAAGATGTCG
 CCAGCTATTT CTGTCAACAC TATAGCAATT TTCCGTGGAC CTTCGGTGGA
 GACACCAAGC TGAATTGAA A

Seqüência V_H

ID. DE SEQ. Nº: 60 (a seqüência sublinhada é uma seqüência de CDR)
 QVQLTESGPG LVQPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSLT SHHISWVRQP PGKGLEWVGV
MWNDGGTLYN SALKSRPSIS RDTSKSQVFL KMSSLQTEDT ATYYCARGKM
HYYVLD~~AWGQ~~ GASVTVS

ID. DE SEQ. Nº: 61

CAGGTGCAGC TGACGGACTC AGGGCCTGGC CTGGTGCAGC CCTCACAGAC
 CCTGTCTCTC ACCTGCACTG TCTCTGGGTT CTCATTAACC AGCCATCATA
 TATCCTGGGT TCGACAGCCT CCAGGAAAAG GTCTGGAGTG GGTGGGAGTC
 ATGTGGAATG ATGGAGGCAC ATTATATAAT TCAGCTCTCA AGTCTCGACC
 GAGCATCAGT AGGGACACCT CCAAGAGTCA GGTCTTCTTA AAAATGAGCA
 GTCTGCAAAC TGAAGACACA GCCACTTACT ACTGTGCCAG GGGCAAATG
 CATTACTATG TTCTGGATGC CTGGGGTCAA GGAGCTTCAG TCACTGTCTC
 G

FIG. 12

Anti-Human CD154 (CD40L) Antibodies (Chimaeric Fab')
 = Anticorpos anti-CD154 humano (CD40L) (Fab' quimérico)

Anticorpo	Kd Biacore (pM)	IC50 da ligação de CD40 (ng/ml)	Ic50 da supra-regulação de ICAM-1 (ng/ml)
Hu5c8 (Ig inteira)	23	16 (n=6)	43 (n=10)
CA081-00294 (294)	107	26 (n=2)	364 (n=6)
CA081-00295 (295)	51	15 (n=2)	138 (n=6)
CA081-00300 (300)	43	15 (n=2)	113 (n=7)
CA081-00335 (335)	42	-	279 (n=3)
CA081-00303 (303)	130	51 (n=3)	252 (n=3)
CA081-00338 (338)	15	6 (n=2)	192 (n=6)
CA081-00342 (342)	16	8 (n=5)	53 (n=6)
CA081-00381 (381)	5	22 (n=2)	100 (n=2)
CA081-00402 (402)	48	12 (n=2)	92 (n=2)

FIG. 13

Cadeia leve kapa de hu5c8

ID. DE SEQ. Nº: 62 (a seqüência sublinhada é a seqüência sinalizadora)

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS
 SSTYSYMHWY QQKPGQPPKL LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS
 SVEPEDFATY YCQHSWEIPP TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

ID. DE SEQ. Nº: 63 (proteína madura)

DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS SSTYSYMHWY QQKPGQPPKL
 LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SVEPEDFATY YCQHSWEIPP
 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV
 THQGLSSPVT KSFNRGEC

ID. DE SEQ. Nº: 64 (quadro de leitura aberta)

ATGGAGACAG ACACACTCCT GTTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTCCAGG
 TTCCACTGGT GACATTGTAC TGACACAGTC TCCTGCTACC TTATCTGTAT
 CTCCGGGAGA GAGGGCCACC ATCTCATGCA GGGCCAGCCA ACGTGTCCAGT
 TCATCTACCT ATAGTTATAT GCACTGGTAC CAACAGAAAC CAGGACAGCC
 ACCCAAATC CTCATCAAGT ATGCATCCAA CCTAGAATCT GGGGTCCCTG
 CCAGGTTTCCAG TGGCAGTGGG TCTGGGACTG ACTTCACCT CACCATCTCT
 TCTGTGGAGC CGGAGGATTT TGCAACATAT TACTGTCCAGC ACAGTTGGGA
 GATTCCTCCG ACGTTCGGTG GAGGGACCAA GCTGGAGATC AAACGAACTG
 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
 TCTGGAACTG CCTCTGTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACCTCC
 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
 AGCACCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
 ACAGGGGAGA GTGTTAG

FIG. 14

Cadeia pesada de hu5c8 aglyP-hulgG4

ID. DE SEQ. Nº: 65 (a seqüência sublinhada é a seqüência sinalizadora)

<u>MDWTWRVFCL</u>	<u>LAVAPGAHSO</u>	<u>VQLVQSGAEV</u>	<u>VKPGASVKLS</u>	<u>CKASGYIFTS</u>
<u>YYMYWVKQAP</u>	<u>GQGLEWIGEI</u>	<u>NPSNGDTNFN</u>	<u>EKFKSKATLT</u>	<u>VDKSASTAYM</u>
<u>ELSSLRSED</u>	<u>AVYYCTRS</u>	<u>RNDMDSWGQ</u>	<u>TLVTVSSAST</u>	<u>KGPSVFPLAP</u>
<u>CSRSTSESTA</u>	<u>ALGCLVKDYF</u>	<u>PEPVTVSWNS</u>	<u>GALTSGVHTF</u>	<u>PAVLQSSGLY</u>
<u>SLSSVVTVPS</u>	<u>SSLGTKTYTC</u>	<u>NVDHKPSNTK</u>	<u>VDKRVESKYG</u>	<u>PPCPPCPAPE</u>
<u>FLGGPSVFLF</u>	<u>PPKPKDTLMI</u>	<u>SRTPEVTCVV</u>	<u>VDVSQEDPEV</u>	<u>QFNWYVDGVE</u>
<u>VHNAKTKPRE</u>	<u>EQFNSAYRVV</u>	<u>SVLTVLHQDW</u>	<u>LNGKEYKCKV</u>	<u>SNKGLPSSIE</u>
<u>KTISKAKGQP</u>	<u>REPQVYTLPP</u>	<u>SQEEMTKNQV</u>	<u>SLTCLVKGFY</u>	<u>PSDIAVEWES</u>
<u>NGQPENNYKT</u>	<u>TPPVLDSDGS</u>	<u>FFLYSRLTVD</u>	<u>KSRWQEGNVF</u>	<u>SCSVMHEALH</u>
<u>NHYTQKLSLS</u>	<u>SLG</u>			

ID. DE SEQ. Nº: 66 (proteína madura: as mutações S228P/T299A estão sublinhadas e em negrito)

<u>QVQLVQSGAE</u>	<u>VVKPGASVKL</u>	<u>SCKASGYIFT</u>	<u>SYMYWVKQA</u>	<u>PGQGLEWIGE</u>
<u>INPSNGDTNF</u>	<u>NEKFKSKATL</u>	<u>TVDKSASTAY</u>	<u>MELSSLRSED</u>	<u>TAVYYCTRS</u>
<u>GRNDMDSWGQ</u>	<u>GTLVTVSSAS</u>	<u>TKGPSVFPLA</u>	<u>PCSRSTSEST</u>	<u>AALGCLVKDY</u>
<u>FPEPVTVSWN</u>	<u>SGALTSGVHT</u>	<u>FPAVLQSSGL</u>	<u>YSLSSVVTVP</u>	<u>SSSLGTKTYT</u>
<u>CNVDHKPSNT</u>	<u>KVDKRVESKY</u>	<u>GPPCPPCPAP</u>	<u>EFLGGPSVFL</u>	<u>FPPKPKDTLM</u>
<u>ISRTPEVTCV</u>	<u>VVDVSQEDPE</u>	<u>VQFNWYVDGV</u>	<u>EVHNAKTKPR</u>	<u>EEQFNSAYRV</u>
<u>VSVLTVLHQD</u>	<u>WLNGKEYKCK</u>	<u>VSNKGLPSSI</u>	<u>EKTISKAKGQ</u>	<u>PREPQVYTLF</u>
<u>PSQEEMTKNQ</u>	<u>VSLTCLVKGF</u>	<u>YPSDIAVEWE</u>	<u>SNGQPENNYK</u>	<u>TPPVLDSDG</u>
<u>SFFLYSRLTV</u>	<u>DKSRWQEGNV</u>	<u>FSCSVMHEAL</u>	<u>HNHYTQKLSL</u>	<u>LSLG</u>

ID. DE SEQ. Nº: 67

<u>ATGGACTGGA</u>	<u>CCTGGAGGGT</u>	<u>CTTCTGCTTG</u>	<u>CTGGCTGTAG</u>	<u>CACCAGGTGC</u>
<u>CCACTCCCAG</u>	<u>GTCCAACCTGG</u>	<u>TGCAGTCAGG</u>	<u>GGCTGAAGTG</u>	<u>GTGAAGCCTG</u>
<u>GGGCTTCAGT</u>	<u>GAAGTTGTCC</u>	<u>TGCAAGGCTT</u>	<u>CTGGCTACAT</u>	<u>CTTCACCAGT</u>
<u>TATTATATGT</u>	<u>ACTGGGTGAA</u>	<u>GCAGGCGCCC</u>	<u>GGACAAGGCC</u>	<u>TTGAGTGGAT</u>
<u>TGGAGAGATT</u>	<u>AATCCTAGCA</u>	<u>ATGGTGATAC</u>	<u>TAACCTCAAT</u>	<u>GAGAAGTTCA</u>
<u>AGAGTAAGGC</u>	<u>CACACTGACT</u>	<u>GTAGACAAAT</u>	<u>CCGCCAGCAC</u>	<u>AGCATACATG</u>
<u>GAGCTCAGCA</u>	<u>GCCTGAGGTC</u>	<u>TGAGGACACT</u>	<u>GCGGTCTATT</u>	<u>ACTGTACAAG</u>
<u>ATCGGACGGT</u>	<u>AGAAATGATA</u>	<u>TGGACTCCTG</u>	<u>GGCCAAGGG</u>	<u>ACCCTGGTCA</u>
<u>CCGTCTCCTC</u>	<u>AGCTTCCACC</u>	<u>AAGGGCCCAT</u>	<u>CCGTCTTCCC</u>	<u>CCTGGCGCCC</u>
<u>TGCTCCAGAT</u>	<u>CTACCTCCGA</u>	<u>GAGCACAGCC</u>	<u>GCCCTGGGCT</u>	<u>GCCTGGTCAA</u>
<u>GGACTACTTC</u>	<u>CCCGAACCGG</u>	<u>TGACGGTGTC</u>	<u>GTGGAACTCA</u>	<u>GGCGCCCTGA</u>
<u>CCAGCGGCGT</u>	<u>GCACACCTTC</u>	<u>CCGGCTGTCC</u>	<u>TACAGTCCTC</u>	<u>AGGACTCTAC</u>
<u>TCCCTCAGCA</u>	<u>GCGTGGTGAC</u>	<u>CGTGCCCTCC</u>	<u>AGCAGCTTGG</u>	<u>GCACGAAGAC</u>
<u>CTACACCTGC</u>	<u>AACGTAGATC</u>	<u>ACAAGCCCAG</u>	<u>CAACACCAAG</u>	<u>GTGGACAAGA</u>
<u>GAGTTGAGTC</u>	<u>CAAATATGGT</u>	<u>CCCCATGCC</u>	<u>CACCGTGCCC</u>	<u>AGCACCTGAG</u>
<u>TTCTGGGGG</u>	<u>GACCATCAGT</u>	<u>CTTCTGTTC</u>	<u>CCCCAAAAC</u>	<u>CCAAGGACAC</u>
<u>TCTCATGATC</u>	<u>TCCCGGACCC</u>	<u>CTGAGGTCAC</u>	<u>GTGCGTGGTG</u>	<u>GTGGACGTGA</u>
<u>GCCAGGAAGA</u>	<u>CCCCGAGGTC</u>	<u>CAGTTCAACT</u>	<u>GGTACGTGGA</u>	<u>TGGCGTGGAG</u>

FIG. 14 (continuação)

GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCGCGTA
CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCGTC CTCCATCGAG
AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAGCCAC AAGTGTACAC
CCTGCCCCCA TCCCAGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TCCTCGATTG
CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAGGCT AACCGTGGAC AAGAGCAGGT
GGCAGGAGGG GAATGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
AACCACTACA CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCTGGGTT GA

FIG. 15

Cadeia leve kapa de hu342

ID. DE SEQ. Nº: 68 (a seqüência sublinhada é a seqüência sinalizadora)

MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RCDIQMTQSP SSLASVGD VTITCRASED
 LYYNLAWYQR KPGKAPKLLI YDTYRLADGV PSRFSGSGSG TDYTLTISSL
 QPEDFASYC QYYKFPFTF GOGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
 TASVVCLLNN FYBREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST
 LTLKADYK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

ID. DE SEQ. Nº: 69 (proteína madura)

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCRASEDLY YNLAWYQRKP GKAPKLLIYD
 TYRLADGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFASYCQQ YYKFPFTFGQ
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY BREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSK STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK

ID. DE SEQ. Nº: 70 (quadro de leitura aberta)

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TACTCTGGCT
 CCGAGGTGCC AGATGTGATA TCCAGATGAC CCAGAGTCCA AGCAGTCTCT
 CCGCCAGCGT AGGCGATCGT GTGACTATTA CCTGTCTGTC CAGTGAGGAC
 CTCTATTACA ACCTGGCCTG GTATCAGCGT AAACCGGGCA AAGCCCCGAA
 GCTGCTCATC TATGATACGT ACCGCCTGGC TGACGGTGTG CCAAGCCGTT
 TCAGTGGCAG TGGCAGCGGT ACTGACTATA CCCTCACAAAT TTCGTCTCTC
 CAGCCGGAAG ATTTGCCTC TTAATATTGT CAGCAATATT ACAAGTTCCC
 TTTCACCTTC GGTCAAGGCA CTAAAGTAGA AATCAAACGT ACGGTGGCTG
 CACCATCTGT CTTTATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
 GAGAGTGTTA G

FIG. 16

Cadeia pesada de hu342 aglyP-hulgG4

ID. DE SEQ. Nº: 71 (a seqüência sublinhada é the seqüência sinalizadora)

MDWTWRVFCL LAVAPGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAVSGFSSTN
 YVHWVRQAP GKGLEWGMVI WGDGDSYNS VLKSRFTISR DTSKNTVYLO
 MNSLRAEDTA VYYCARQLTH YYVLAAWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP
 CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE
 FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE
 VHNATKPRE EQFN^SAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE
 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
 NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH
 NHYTQKSLSL SLG

ID. DE SEQ. Nº: 72 (proteína madura: as mutações S228P/T299A estão sublinhadas e em negrito)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFSST NYVHWVRQA PGKLEWGMV
 IWGDGDSYN SVLKSRFTIS RDTSKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCARQLT
 HYYVLAAWGQ GTLTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT
 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY **GPPCP**CPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNATKPR **EEQFN**SAYRV
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTL
 PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSG
 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL LSLG

ID. DE SEQ. Nº: 73

ATGACTGGA CCTGGAGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG CACCAGGTGC
 CCACTCCGAA GTACAATTGG TCGAGTCTGG AGGCGGGCTT GTCCAGCCTG
 GTGGGAGCCT GCGTCTCTCT TGTGCAGTGA GCGGCTTCAG CTCTACCAAT
 TACCATGTGC ACTGGGTGCG TCAGGCACCT GGAAGGGCC TGGAGTGGAT
 GGGTGTTATT TGGGGCGACG GCGATACATC CTACAACCTCC GTCCTGAAGA
 GCCGTTTCAC CATTTCCTCGT GACACCTCAA AGAATACCGT TTACCTCCAG
 ATGAACTCTC TCCGCGCAGA GGACACAGCA GTCTATTACT GTGCACGTCA
 ACTGACCCAC TATTACGTTT TGGCAGCCTG GGGTCAAGGG ACTCTGGTCA
 CAGTCTCGAG CGCTTCAACC AAGGGCCCAT CCGTCTTCCC CCTGGCGCCC
 TGCTCCAGAT CTACCTCCGA GAGCACAGCC GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA
 GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGGTGTC GTGGA^AACTCA GGCGCCCTGA
 CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCTC AGGACTCTAC
 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACGAAGAC
 CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA
 GAGTTGAGTC CAAATATGGT CCCCCATGCC CACCGTGGCC AGCACCTGAG
 TTCCTGGGGG GACCATCAGT CTTCTGTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC
 TCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA

FIG. 16 (continuação)

GCCAGGAAGA CCCCAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA TGGCGTGGAG
GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCGCGTA
CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCGTC CTCCATCGAG
AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAGCCAC AAGTGTACAC
CCTGCCCCCA TCCCAGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TCCTCGATTG
CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAGGCT AACCGTGGAC AAGAGCAGGT
GGCAGGAGGG GAATGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
AACCCTACA CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCTGGGTT GA

FIG. 17

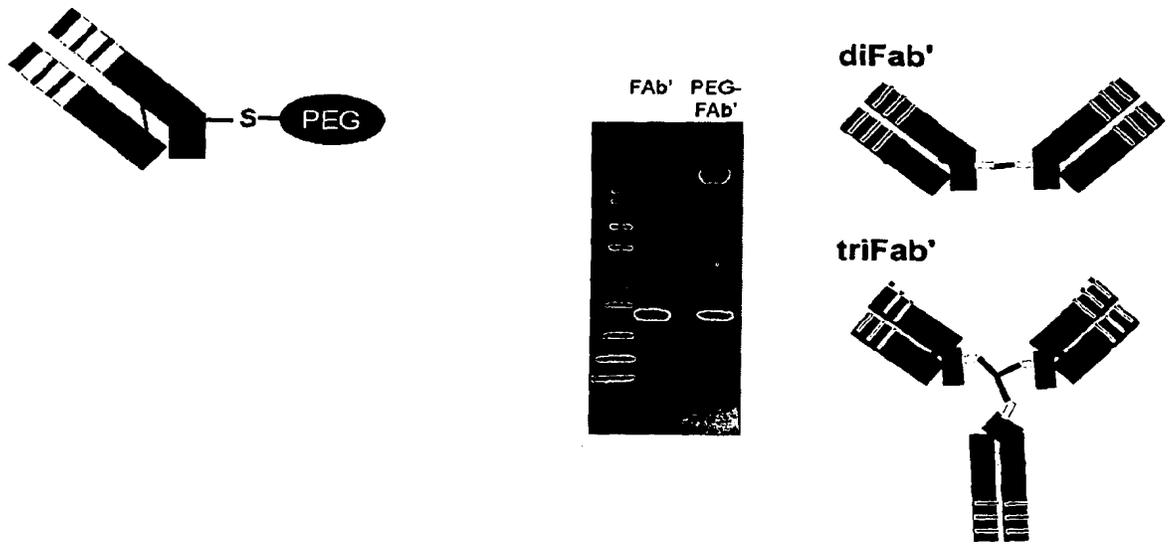


FIG. 18

Perfil de atividade de entidades Fab' e Fab'-PEG de 342

342 = enxerto de gL4gH1

	Kd Biacore (pM)	IC50 da ligação de CD40 (ng/ml)	Ic50 da supra-regulação de ICAM-1 (ng/ml)	Ic50 do Ensaio de competição por ligação (pM)
hu5c8 IgG1	25	31	37	54
342 Fab'	28	12	40	24
342 Fab'-PEG	50	35	127	113
342 Di-Fab'	nd	9	22	nd
342 Di-Fab'-PEG	45	32	58	26
342 Tri-Fab'	nd	9	31	nd
342 Tri-Fab'-PEG	nd	8	36	nd
342 aglycosyl IgG4	nd	25	48	35

FIG. 19

Inibição da resposta imunológica de IgG
ao toxóide tetânico em macacos *Cynomolgus*

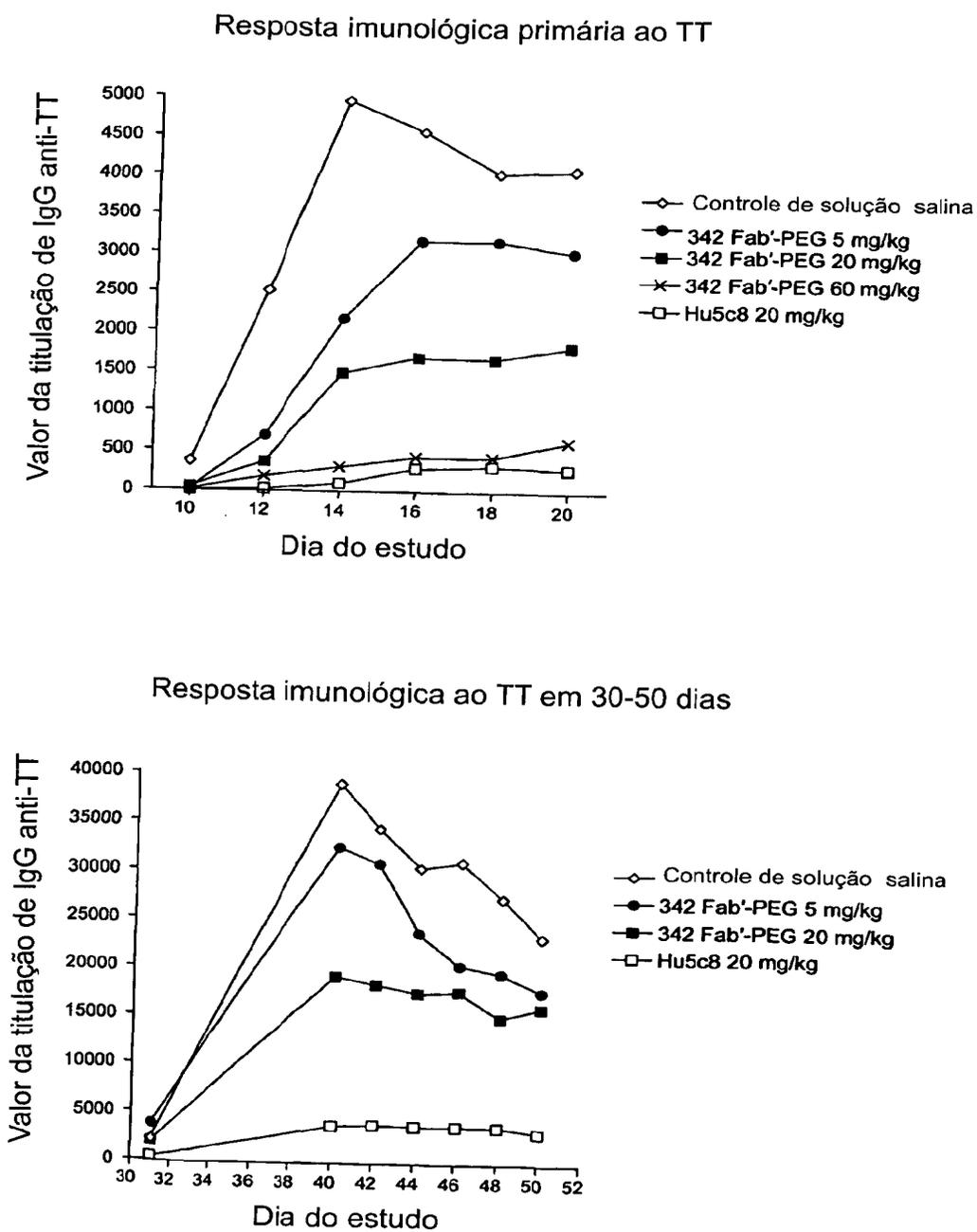


FIG. 20

Inibição da resposta imunológica de IgG
ao toxóide tetânico em macacos *Cynomolgus*

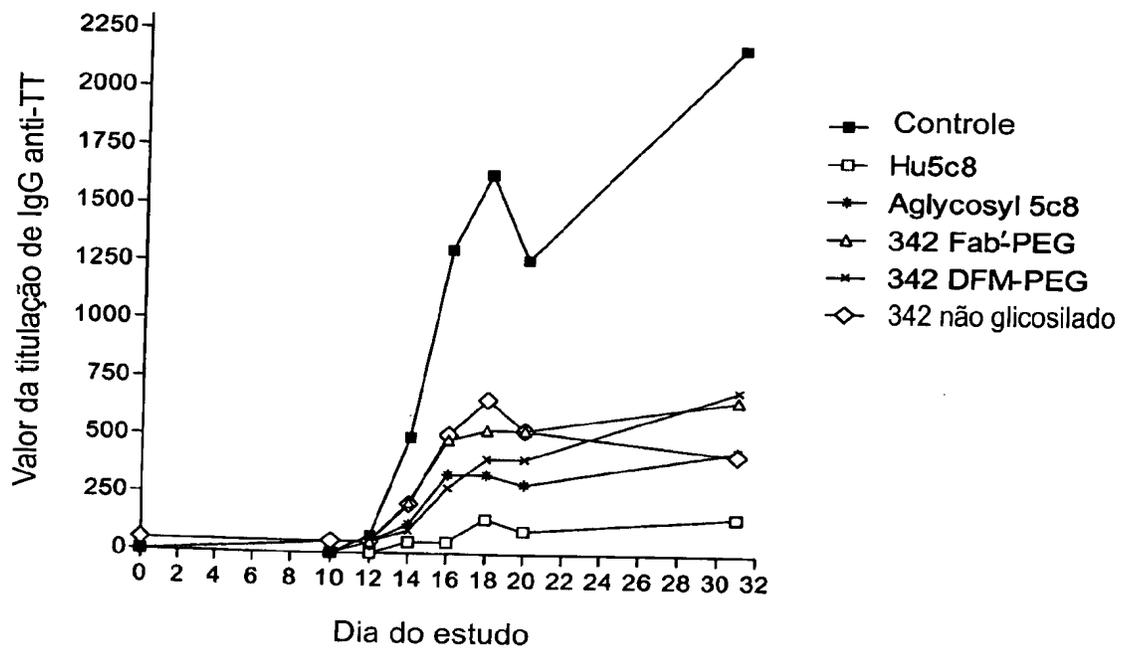


FIG. 21

Resposta imunológica primária de IgM ao toxóide tetânico em macacos Cynomolgus

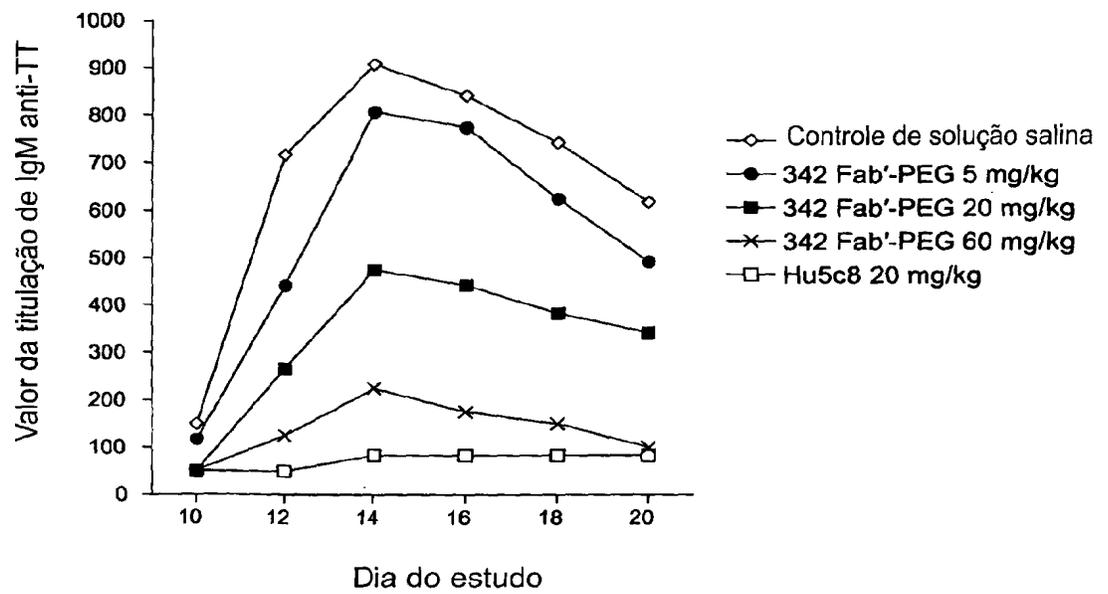


FIG. 22

Farmacocinética de 342 Fab'-PEG em macacos Cynomolgus

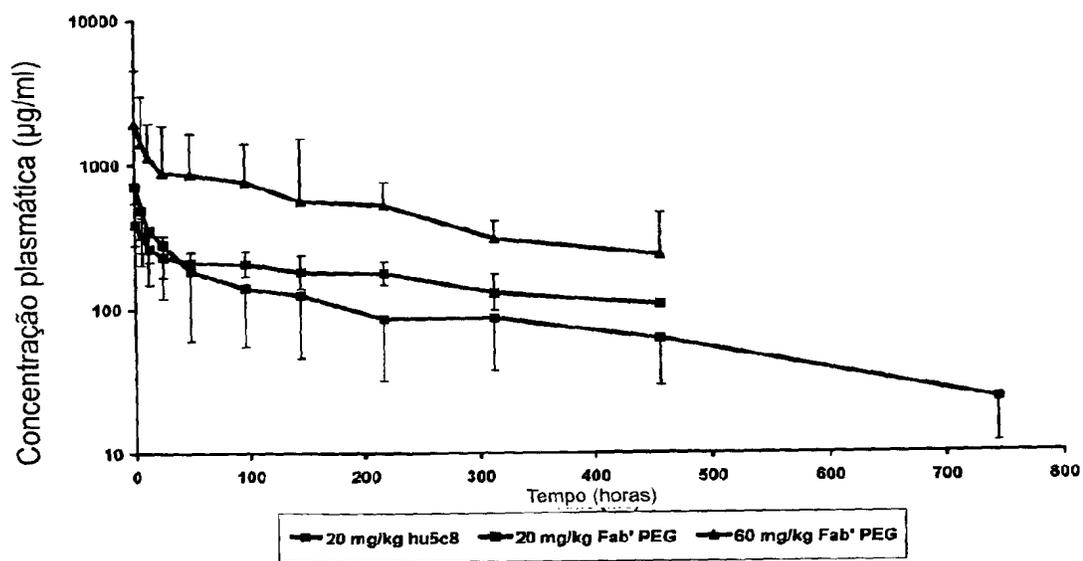


FIG. 23

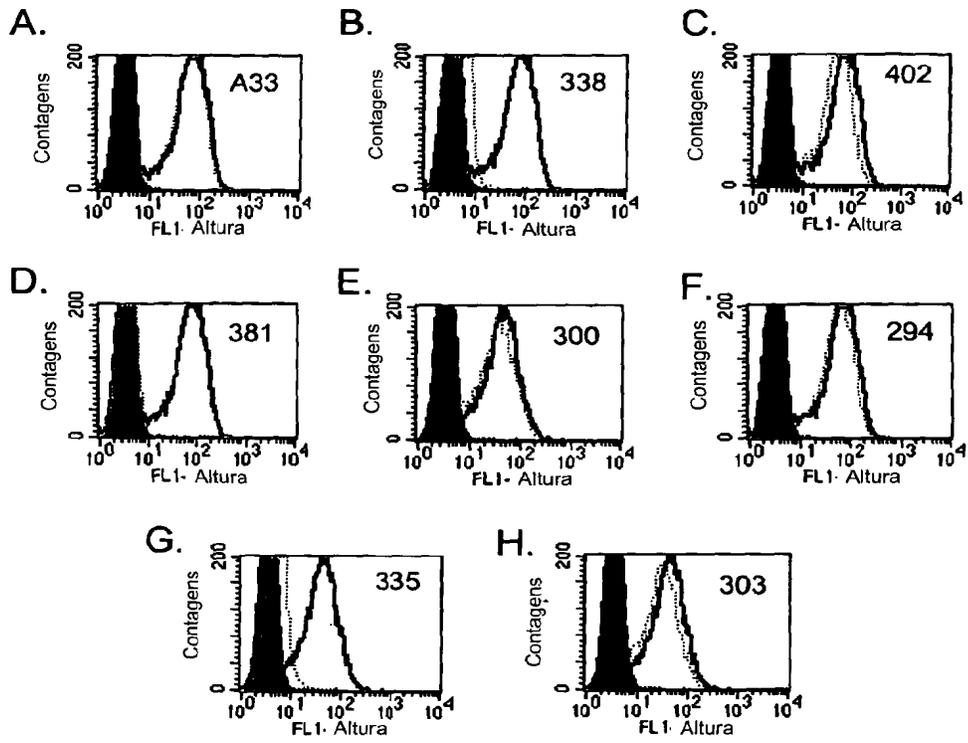


FIG. 24

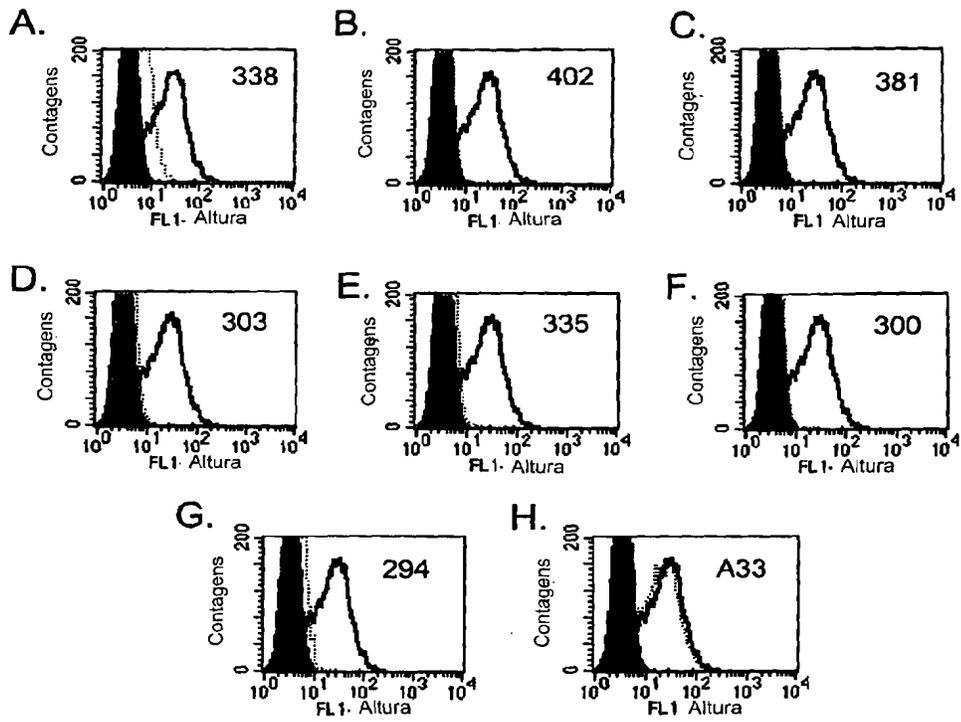
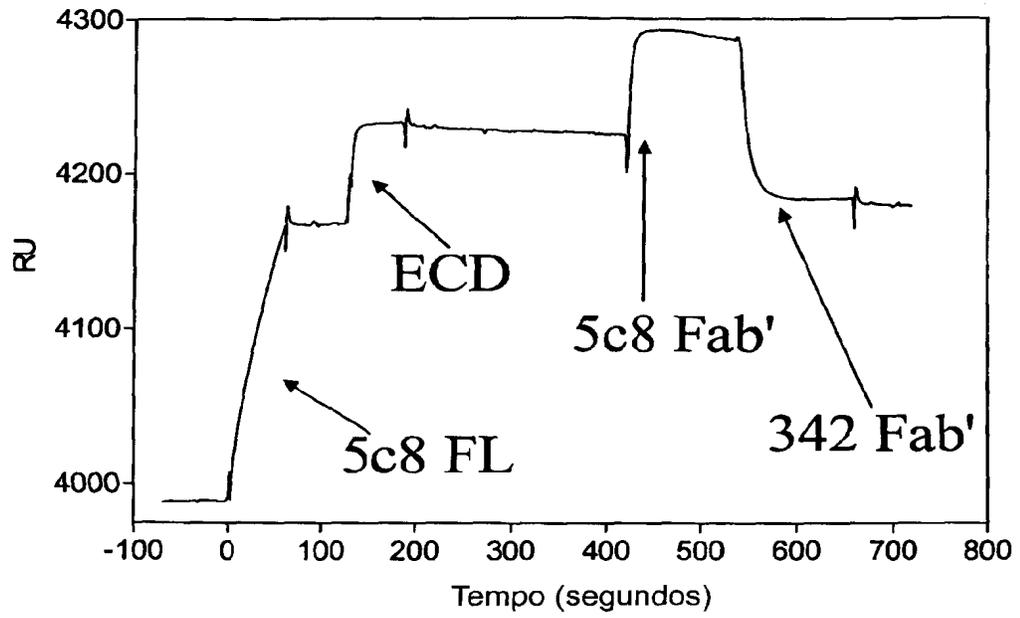


FIG. 25

A.



B.

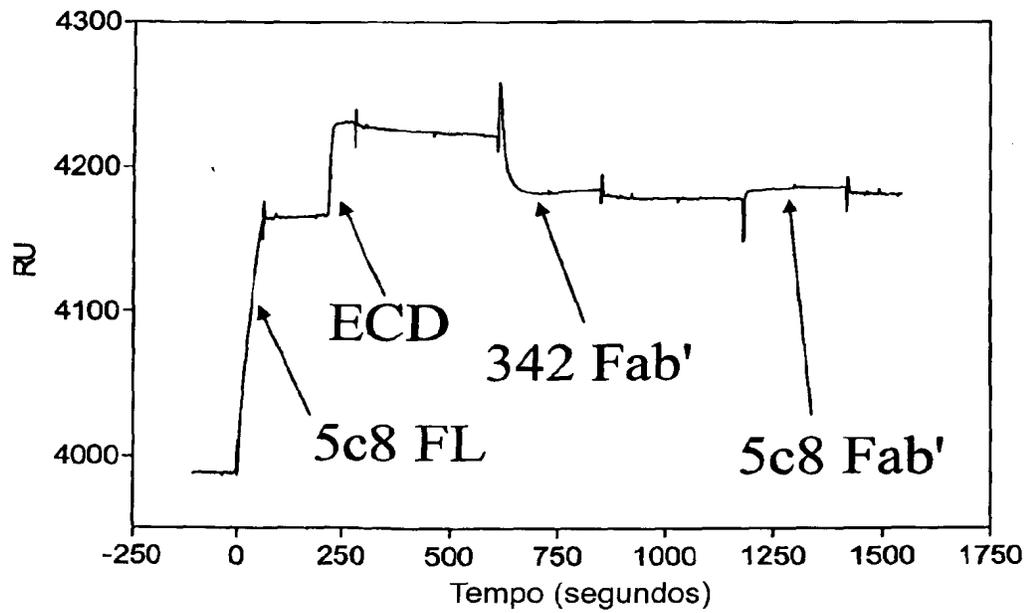


FIG. 25 (continuação)

C.

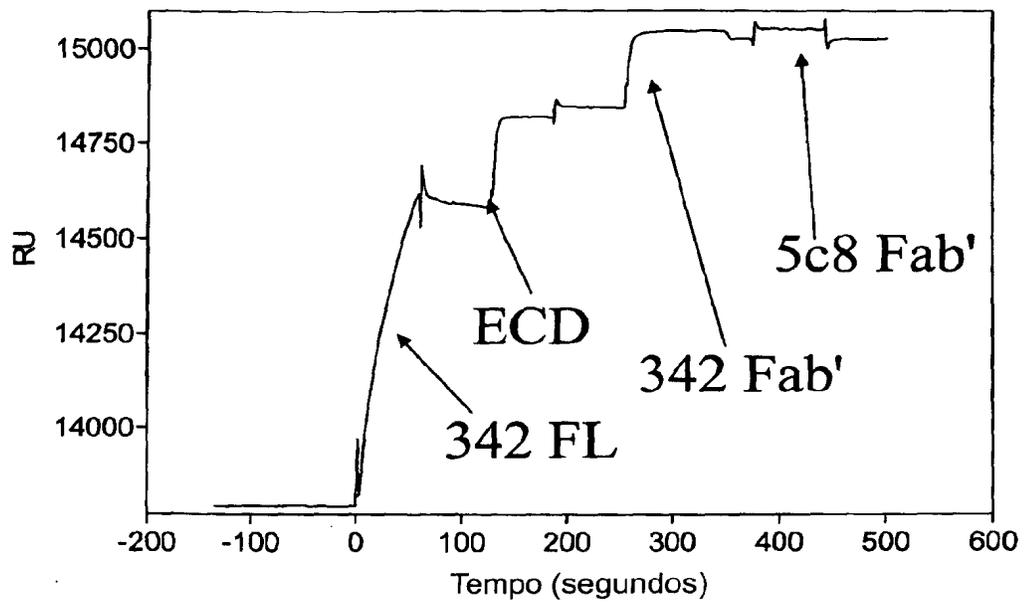
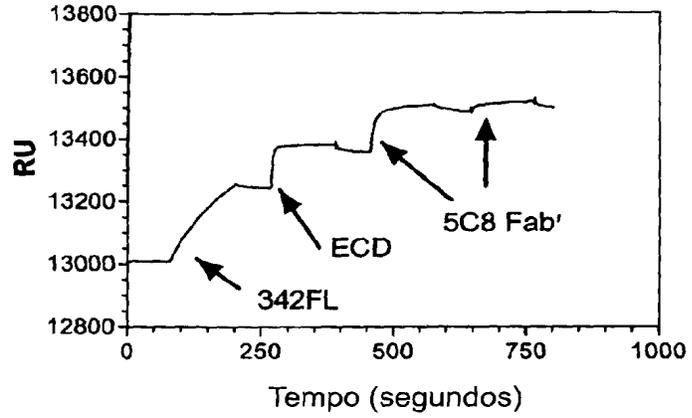
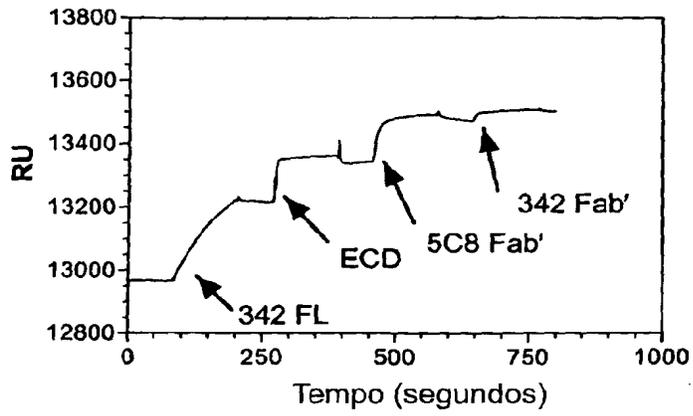


FIG. 25 (continuação)

D.



E.



F.

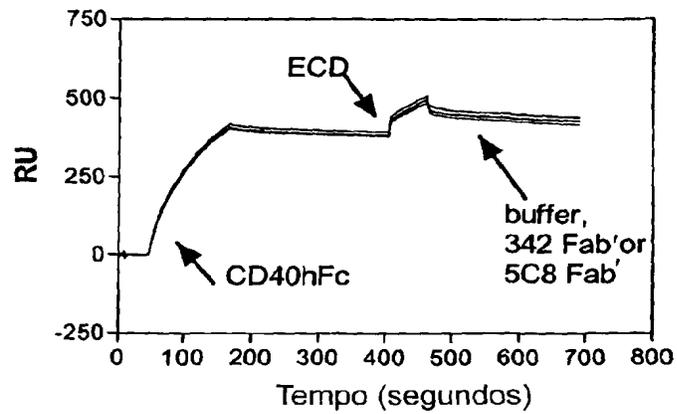
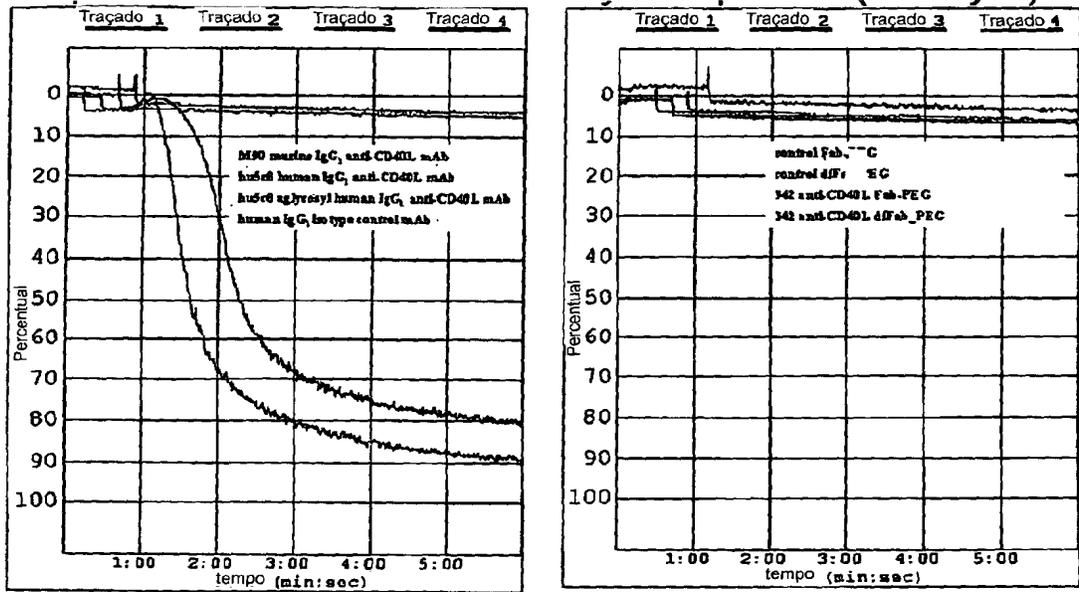


FIG. 26

Agregação plaquetária representativa em resposta aos complexos de rhsCD40L/anticorpo (Ensaio 1)



mAb de isotipo de IgG1 humana de controle



mAb IgG1 anti-CD40L humano hu5c8 não glicosilado

mAb IgG1 anti-CD40L M90 murídeo

mAb IgG1 anti-CD40L hu5c8 humano



342 anti-CD40L diFab'-PEG



342 anti-CD40L diFab'-PEG
diFab'-PEG de controle
Fab'-PEG de controle

FIG. 26 (continuação)

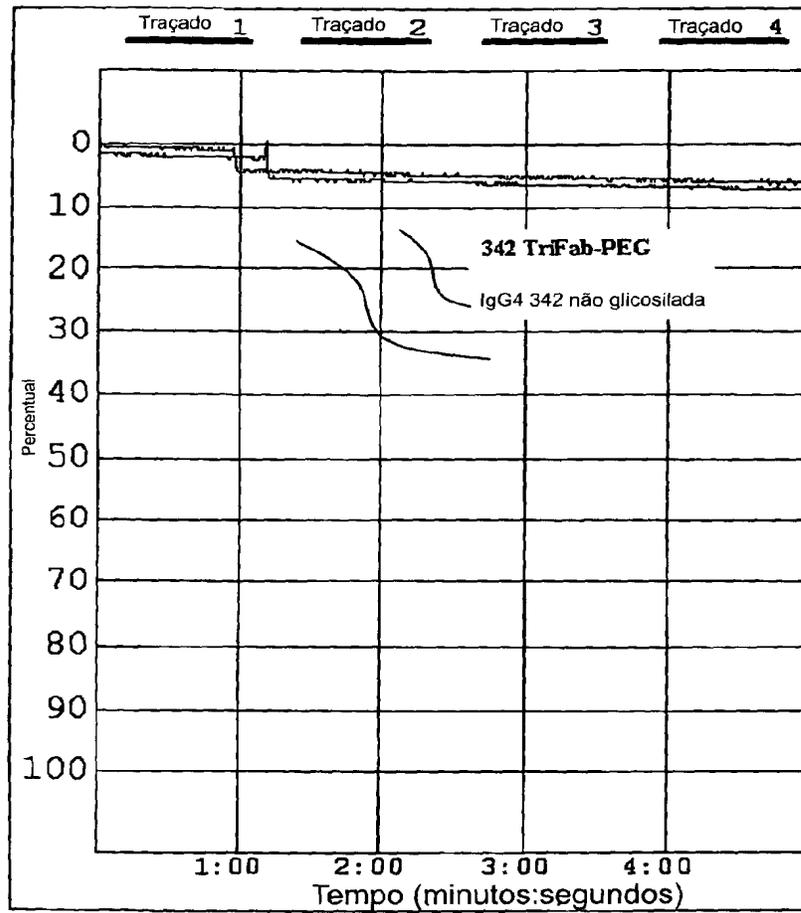


FIG. 27

Agregação plaquetária representativa em resposta aos anticorpos de controle e anti-CD154 (Ensaio 2)

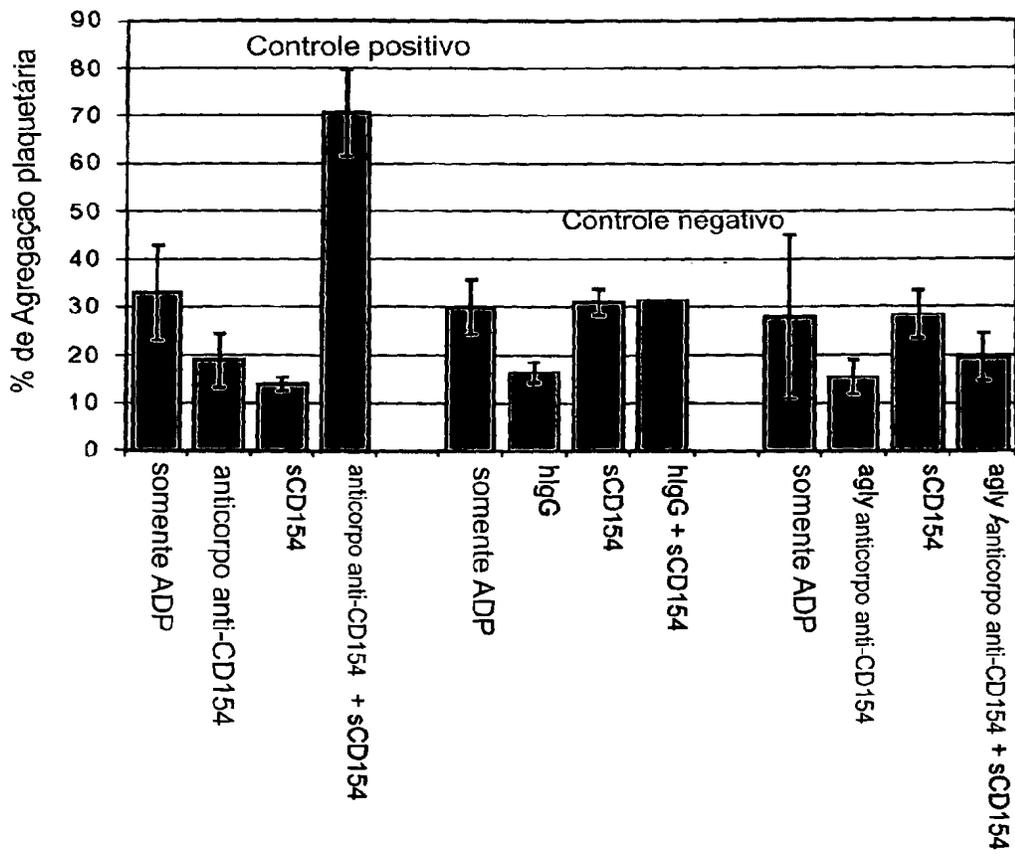


FIG. 28

	<u>1</u>		<u>3</u>	<u>1</u>					
CD40L_Solúvel_Humano	GDQNPQIA	AH	VEASSK	TTSVLQWAEK	GYTMSNNLV TLENGKQLTV				
CD40L_Solúvel_Humano	GDEDPQIA	AHV	SEANSN	AASVLQWAKK	GYTMKSNLV MLENGKQLTV				
	<u>5</u>			<u>2</u>	<u>6</u>		<u>6</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
CD40L_Solúvel_Humano	KRQGLYYIYA	QVT	FCSNREA	SSQAPFIASL	CLKSPGRFER	ILLRAANTHS			
CD40L_Solúvel_Humano	KREGLYVYT	QVT	FCSNREP	SSQRPFIVGL	WLKPSGGER	ILLKAANTHS			
	<u>2</u>		<u>5</u>	<u>3</u>	<u>4</u>				
CD40L_Solúvel_Humano	SAKPCQQSI	HLGGVFELQP	GASVFNVTD	PSQVSHGTGF	TSPGLLKL				
CD40L_Solúvel_Humano	SSQLCEQQSV	HLGGVFELQA	GASVFNVTE	ASQVIHRVGF	SSPGLLKL				

FIG. 29

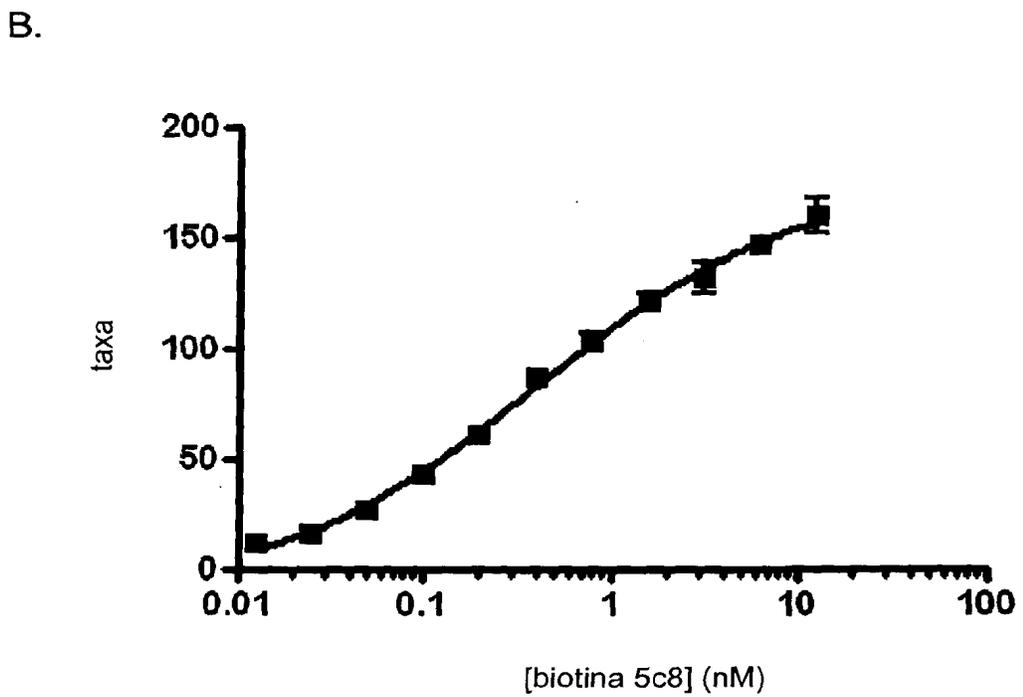
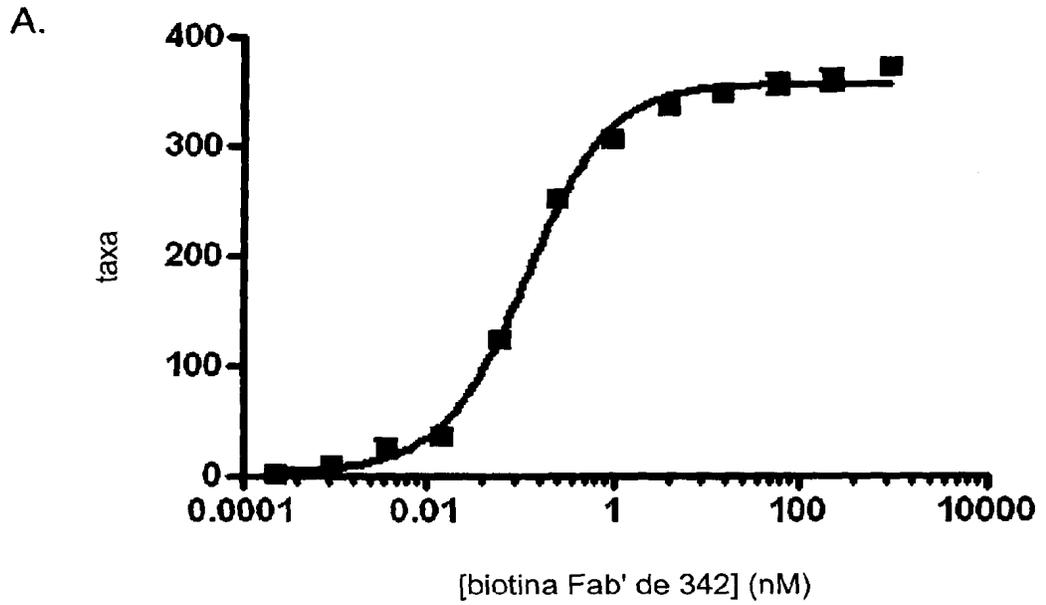
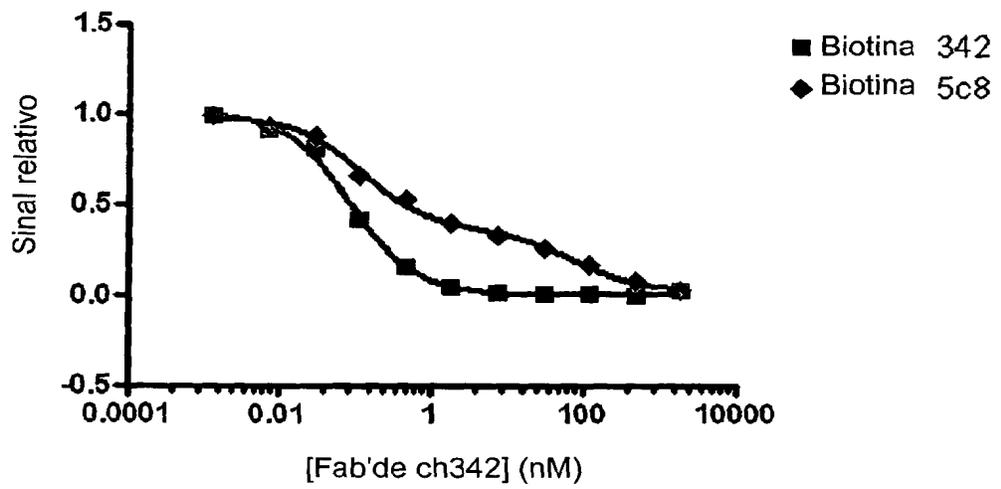
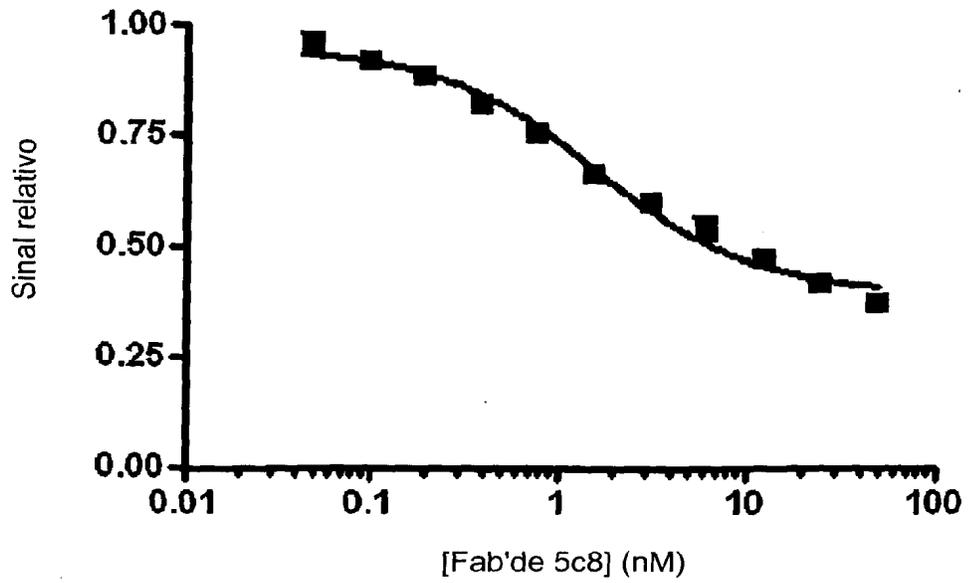


FIG. 29 (continuação)

C.



D.



RESUMO

Patente de Invenção: **"PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO, ANTICORPOS, FRAGMENTOS DE ANTICORPOS, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO E DE DNA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS DOS MESMOS"**.

A presente invenção refere-se a proteínas de ligação, incluindo anticorpos, derivados de anticorpos e fragmentos de anticorpos, que se ligam especificamente à proteína CD154 (CD40L). Esta invenção também fornece um anticorpo quimérico, humanizado ou totalmente humano, derivado de anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente a um epitopo ao qual um Fab fragmento humanizado que compreende uma sequência da cadeia pesada variável de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que compreende uma sequência da cadeia leve variável de acordo com a SEQ ID NO: 2 se liga especificamente. As proteínas de ligação de CD154 desta invenção podem despertar função efetora reduzida em relação a um segundo anticorpo anti-CD154. As proteínas de ligação de CD154 desta invenção são úteis em métodos diagnósticos e terapêuticos como, por exemplo, no tratamento e na prevenção de doenças que incluem aquelas que envolvem respostas imunológicas indesejáveis que são mediadas por interações CD154-CD40.


```

      50              55              60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65              70              75              80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
5              85              90              95
Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
      100              105              110
Leu Val Thr Val Ser
      115
10 <210>      2
   <211>      107
   <212>      PRT
   <213>      Sequência Artificial
   <220>
15 <223>      Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
      tético
   <400>      2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15
20 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn
      20              25              30
Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35              40              45
Tyr Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
25      50              55              60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80
Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Lys Phe Pro Phe
      85              90              95
30 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100              105
<210>      3

```

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 5 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 3
 Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr His Val His
 1 5 10
 <210> 4
 10 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 15 <400> 4
 Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 5
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 5
 25 Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético

<400> 6
 Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn Leu Ala
 1 5 10
 <210> 7
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 10 <400> 7
 Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp
 1 5
 <210> 8
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 8
 20 Gln Gln Tyr Tyr Lys Phe Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 9
 <211> 117
 <212> PRT
 25 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético
 <400> 9
 30 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr

		20					25					30				
	His	Val	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35						40					45			
	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Ser	Val	Leu	Lys
5		50					55					60				
	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
	65					70					75				80	
	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
					85					90					95	
10	Arg	Gln	Leu	Thr	His	Tyr	Tyr	Val	Leu	Ala	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
					100					105					110	
	Leu	Val	Thr	Val	Ser											
					115											
	<210>				10											
15	<211>				117											
	<212>				PRT											
	<213>				Sequência Artificial											
	<220>															
	<223>				Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético											
20	<400>				10											
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Ser	Thr	Asn	Tyr
25					20					25					30	
	His	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35								40					45	
	Ser	Val	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Ser	Val	Leu	Lys
		50								55					60	
30	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
	65						70				75				80	
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala

<213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

5 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30

10 His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 15 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

20 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 25 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

30 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gln Pro Lys Ser Cys

180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 5 210 215 220
 His Thr Cys Ala Ala
 225
 <210> 14
 <211> 107
 10 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
 tético
 15 <400> 14
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn
 20 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 25 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Lys Phe Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 15
 <211> 214
 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

5 <400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 15 65 70 75 80

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

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

20 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 25 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

30 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 16

<211> 321

<212> DNA

5 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético

<400> 16

10 gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgtc gtgccagtga ggacctctat tacaacctgg cctggtatca gcaaaaaccg 120
 ggcaaagccc cgaagctgct catctatgat acgtaccgcc tggctgacgg tgtgccaagc 180
 cgtttcagtg gcagtggcag cggactgac ttaccctca caatttcgtc tctccagccg 240
 gaagatttcg ccacttacta ttgtcagcaa tattacaagt tccctttcac cttcggtcag 300

15 ggactaaag tagaaatcaa a 321

<210> 17

<211> 321

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

20 <220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético

<400> 17

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60

25 attacctgtc gtgccagtga ggacctctat tacaacctgg cctggtatca gcgtaaaccg 120
 ggcaaagccc cgaagctgct catctatgat acgtaccgcc tggctgacgg tgtgccaagc 180
 cgtttcagtg gcagtggcag cggactgac tataccctca caatttcgtc tctccagccg 240
 gaagatttcg cctcttacta ttgtcagcaa tattacaagt tccctttcac cttcggtcag 300
 ggactaaag tagaaatcaa a 321

30 <210> 18

<211> 705

<212> DNA

<213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético

5 <400> 18
 atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
 gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
 actattacct gtcgtgccag tgaggacctc tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa 180
 ccgggcaaag ccccgaagct gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgtgcca 240
 10 agccgtttca gtggcagtg ggcggtact gactataccc tcacaatttc gtctctccag 300
 ccggaagatt tcgctcttta ctattgtcag caatattaca agttcccttt caccttcggt 360
 cagggcacta aagtagaaat caaacgtacg gtacggccc catctgtctt catcttcccg 420
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
 15 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
 ggcctgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg agtgt 705

<210> 19
 <211> 351

20 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético

25 <400> 19
 caggtgcagc tgcaggagtc tggaccgggg cttgtcaagc ctagtgagac cctgagcctc 60
 acttgtaccg tgagcggcct cagctctacc aattaccatg tgactggat tcgtcagcca 120
 cctgggaag gcttggagt gattgggtgtt atttggggcg acggcgatac atcctacaac 180
 tccgtcctga agagccgtgt caccatttcc gttgacacct caaagaatca attttccctc 240
 30 aagttgagct ctgtcaccgc agcggacaca gcagtctatt actgtgcacg tcaactgacc 300
 cactattacg ttttggcagc ctgggggtcaa gggactctgg tcacagtctc g 351

<210> 20

<211> 351
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 5 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético
 <400> 20
 gaggtgcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggtgggag cctgcgtctc 60
 tcttgtgcag cgagcggcctt cagctctacc aattaccatg tgcactgggt gcgtcagcca 120
 10 cctgggaagg gcctggagtg ggtgagtgtt atttggggcg acggcgatac atcctacaac 180
 tccgtcctga agagccgttt caccatttcc cgtgacaact caaagaatac cctttacctc 240
 cagatgaact ctctccgcgc agaggacaca gcagtctatt actgtgcacg tcaactgacc 300
 cactattacg ttttggcagc ctgggggtcaa gggactctgg tcacagtctc g 351
 <210> 21
 15 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético
 20 <400> 21
 caggtgcagc tgcaggagtc tggaccgggg cttgtcaagc ctagtgagac cctgagcctc 60
 acttgtaccg tgagcggcctt cagctctacc aattaccatg tgcactggat tcgtcagcca 120
 cctgggaagg gcctggagtg gatgggtgtt atttggggcg acggcgatac atcctacaac 180
 25 tccgtcctga agagccgtgt caccatttcc cgtgacacct caaagaatca agtttcctc 240
 aagttgagct ctgtcaccgc agcggacaca gcagtctatt actgtgcacg tcaactgacc 300
 cactattacg ttttggcagc ctgggggtcaa gggactctgg tcacagtctc g 351
 <210> 22
 <211> 351
 30 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético

<400> 22

gaggtgcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggtgggag cctgcgtctc 60

5 tcttgtgcag tgagcggctt cagctctacc aattaccatg tgcactgggt gcgtcaggca 120

cctgggaagg gcctggagtg gatgggtggt atttggggcg acggcgatac atcctacaac 180

tccgtcctga agagccgttt caccatttcc cgtgacacct caaagaatac cgtttacctc 240

cagatgaact ctctccgcg agaggacaca gcagtctatt actgtgcacg tcaactgacc 300

cactattacg ttttggcagc ctgggggtcaa gggactctgg tcacagtctc g 351

10 <210> 23

<211> 663

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

15 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético

<400> 23

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggtgggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag tgagcggctt cagctctacc aattaccatg tgcactgggt gcgtcaggca 120

20 cctgggaagg gcctggagtg gatgggtggt atttggggcg acggcgatac atcctacaac 180

tccgtcctga agagccgttt caccatttcc cgtgacacct caaagaatac cgtttacctc 240

cagatgaact ctctccgcg agaggacaca gcagtctatt actgtgcacg tcaactgacc 300

cactattacg ttttggcagc ctgggggtcaa gggactctgg tcacagtctc gagcgcttct 360

aaaagggcc catcgggtctt ccccttgga cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420

25 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac tccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480

tcaggcggc tgaccagcgg cgtgcacacc tccccgctg tcctacagtc ctgaggactc 540

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggctcgaca agaaagtga gcccaaatct 660

tgt 663

30 <210> 24

<211> 687

<212> DNA

<213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético

5 <400> 24
 gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggtgggag cctgcgtctc 60
 tcttgtgcag tgagcggctt cagctctacc aattaccatg tgactgggt gcgtcaggca 120
 cctgggaagg gcctggagtg gatgggtggt atttggggcg acggcgatac atcctacaac 180
 tccgtcctga agagccgttt caccatttcc cgtgacacct caaagaatac cgtttacctc 240
 10 cagatgaact ctctccgcg agaggacaca gcagtctatt actgtgcacg tcaactgacc 300
 cactattacg ttttggcagc ctggggctca gggactctgg tcacagtctc gagcgcttct 360
 acaaagggcc catcggctct ccccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac tccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcggcc tgaccagcgg cgtgcacacc tccccgctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 15 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagttga gcccaaactc 660
 tgtgacaaaa ctcacacatg cgccgcg 687

<210> 25
 <211> 384

20 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético

25 <400> 25
 atgaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
 gctgatatcc agatgacca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
 actattacct gtcgtgccag tgaggacctc tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa 180
 ccgggcaaag ccccgaaact gtcctctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgcca 240
 30 agccgtttca gtggcagtgg cagcggctact gactataccc tcacaatttc gtctctccag 300
 ccggaagatt tcgcctctta ctattgtcag caatattaca agttcccttt caccttcggt 360
 cagggcacta aagtagaaat caaa 384

<210> 26
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 5 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético
 <400> 26
 atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
 10 gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggtgg gagcctgcgt 120
 ctctcttgtg cagtgagcgg cttcagctct accaattacc atgtgcactg ggtgcgtcag 180
 gcacctggga agggcctgga gtggatgggt gttatttggg gcgacggcga tacatcctac 240
 aactccgtcc tgaagagccg tttcaccatt tcccgtgaca cctcaaagaa taccgtttac 300
 ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc acgtcaactg 360
 15 acccactatt acgttttggc agcctggggg caagggactc tggtcacagt ctcgagcgct 420
 tctacaaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
 20 atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtcg acaagaaagt tgagcccaaa 720
 tcttgt 726
 <210> 27
 <211> 750
 <212> DNA
 25 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético
 <400> 27
 30 atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
 gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggtgg gagcctgcgt 120
 ctctcttgtg cagtgagcgg cttcagctct accaattacc atgtgcactg ggtgcgtcag 180

gcacctggga agggcctgga gtggatgggt gttatattggg gcgacggcga tacatcctac 240
aactccgtcc tgaagagccg tttcaccatt tcccgtgaca cctcaaagaa taccgtttac 300
ctccagatga actctctccg cgagagggac acagcagtct attactgtgc acgtcaactg 360
accactatt acgttttggc agcctgggggt caagggactc tggtcacagt ctcgagcgct 420
5 tctacaaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctggggggc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ccttgaccag cggcgtgac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac 660
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtcg acaagaaagt tgagcccaaa 720
10 tcttgtgaca aaactcacac atgcgccgcg 750
<210> 28
<211> 1438
<212> DNA
<213> Sequência Artificial
15 <220>
<223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético
<400> 28
atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
20 gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
actattacct gtcgtgccag tgaggacctc tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa 180
ccgggcaaag ccccgaagct gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgtgcca 240
agccgtttca gtggcagtg cagcgggtact gactataccc tcacaatttc gtctctccag 300
ccggaagatt tcgcctctta ctattgtcag caatattaca agttcccttt caccttcggt 360
25 cagggcacta aagtagaaat caaacgtacg gtagcggccc catctgtctt catcttcccg 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
30 ggctgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg agtggttaaaa tgaagaagac 720
tgctatagca attgcagtg cgctagctgg tttcgccacc gtggcgcaag ctgaggttca 780
gctggctcag tctggaggcg ggcttgtcca gcctgggtggg agcctgcgctc tctcttgtgc 840

agtgagcggc ttcagctcta ccaattacca tgtgcactgg gtgcgtcagg cacctgggaa 900
 gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatcctaca actccgtcct 960
 gaagagccgt ttcaccattt cccgtgacac ctcaaagaat accgtttacc tccagatgaa 1020
 ctctctccgc gcagaggaca cagcagtcta ttactgtgca cgtcaactga cccactatta 1080
 5 cgttttggca gcctggggtc aagggactct ggtcacagtc tcgagcgctt ctacaaaggg 1140
 cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 1200
 gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 1260
 cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag tcctcaggac tctactcct 1320
 cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 1380
 10 gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtcga caagaaagtt gagcccaaat cttgttaa 1438
 <210> 29
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.
 15 <400> 29
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr
 20 20 25 30
 His Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Arg Ser Gln Val Phe Leu
 25 65 70 75 80
 Lys Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Ala
 100 105 110
 30 Ser Val Thr Val Ser
 115
 <210> 30

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.
 <400> 30

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

<210> 31
 20 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.
 <400> 31

gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtcacc 60
 25 gtcgaatgtc gagcaagtga ggaccttac tataatttag cgtggtatca gcggaaacca 120
 ggaactctc ctcaactcct gatctatgat acatataggt tggcagatgg ggtcccatca 180
 cggttcagtg gcagtgggtc tggcacacag tattctctaa agataaacac cctgccatct 240
 ggagatgtcg caagttatct ctgtcaacag tattacaaat ttccattcac gttcggctca 300
 gggaccaagc tggaactgaa a 321

30 <210> 32
 <211> 351
 <212> DNA

<213> Rattus sp.
 <400> 32
 cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtgcagc cctcagagac cctgtctctc 60
 acctgcactg tctctgggtt ctcatcaacc aattatcatg tgcactgggt tcgacagcct 120
 5 ccaggaaaaa gtcttgagtg gatgggagta atatgggggtg atggagacac atcatataat 180
 tcagttctca aatccccgact gagcatcacc agggacacct ccaggagcca agttttctta 240
 aaaatgagca gtctgcaaac ggaggacact gccacctact attgtgccag gcaattgact 300
 cattactatg ttctggctgc ctgggggtcaa ggagcttcag tcactgtctc g 351
 <210> 33
 10 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.
 <400> 33
 atgggtgtgc ccactcatct cctgggggttg ttgctactgt ggattacaga tgccatatgt 60
 15 gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtcacc 120
 gtcgaatgtc gagcaagtga ggacctttac tataatntag cgtgggatca gcggaaacca 180
 gggaaactctc ctcaactcct gatctatgat acatataggt tggcagatgg ggtcccatca 240
 cggttcagtg gcagtgggtc tggcacacag tattctctaa agataaacac cctgccatct 300
 ggagatgtcg caagttattt ctgtcaacag tattacaaat ttccattcac gttcggctca 360
 20 gggaccaagc tggaaactgaa a 381
 <210> 34
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.
 25 <400> 34
 atggctgtcc tgggtctggt gctctgcctg atgacatttc caagctgtgt cctgtcccag 60
 gtgcagctga aggagtcagg acctggcctg gtgcagccct cagagaccct gtctctcacc 120
 tgcactgtct ctgggttctc atcaaccaat tatcatgtgc actgggttcg acagcctcca 180
 ggaaaaagtc ttgagtggat gggagtaata tgggggtgat gagacacatc atataattca 240
 30 gttctcaaat cccgactgag catcaccagg gacacctcca ggagccaagt tttcttaaaa 300
 atgagcagtc tgcaaacgga ggacactgcc acctactatt gtgccaggca attgactcat 360
 tactatgttc tggctgcctg ggggtcaagga gcttcagtca ctgtctcg 408

<210> 35
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 35
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 10 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 15 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 20 <210> 36
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 25 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caactacta ctgtcaacag agttacagta ccccttggac gttcggccaa 300
 30 gggaccaagg tggaatcaa a 321
 <210> 37
 <211> 111

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 10 Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 15 85 90 95
 Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 <210> 38
 <211> 333
 20 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccgtcagt agcaactaca tgagctgggt ccgccaggct 120
 25 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt atttatagcg gtggtagcac atactacgca 180
 gactccgtga agggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag atactttgac 300
 tactggggcc agggaaaccct ggtcaccgtc tcc 333
 <210> 39
 30 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 5 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 10 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 15 100 105 110
 <210> 40
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 40
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccaggggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 25 aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag atactttgac 300
 tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc tcc 333
 <210> 41
 <211> 1459
 <212> DNA
 30 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo

sintético

<400> 41
 atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
 gctgatatcc agatgaccca gaggccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
 5 actattacct gtcgtgccag tgaggacctc tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa 180
 ccgggcaaag ccccgaaact gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgtgcca 240
 agccgtttca gtggcagtg gacgggtact gactataccc tcacaatttc gtctctccag 300
 ccggaagatt tcgctctta ctattgtcag caatattaca agttcccttt caccttcggt 360
 cagggcacta aagtagaaat caaacgtacg gtagecggccc catctgtctt catcttcccg 420
 10 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
 ggctgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg agtggttaaaa tgaagaagac 720
 15 tgctatagca attgcagtg cgctagctgg tttcgccacc gtggcgcaag ctgaggttca 780
 gctggctcag tctggaggcg ggcttgtcca gcctgggtggg agcctgcgct tctcttgtgc 840
 agtgagcggc ttcagctcta ccaattacca tgtgactcgg gtgcgctcagg cacctgggaa 900
 gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatcctaca actccgtcct 960
 gaagagccgt ttcaccattt cccgtgacac ctcaaagaat accgtttacc tccagatgaa 1020
 20 ctctctccgc gcagaggaca cagcagtcta ttactgtgca cgtcaactga cccactatta 1080
 cgttttggca gcctggggtc aagggactct ggtcacagtc tcgagcgctt ctacaaaggg 1140
 cccatcggtc ttccccctgg caccctcttc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 1200
 gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 1260
 cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactcct 1320
 25 cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 1380
 gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtcga caagaaagt gagcccaaat cttgtgacaa 1440
 aactcacaca tgcgcccgc 1459
 <210> 42
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 42
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala
 1 5 10
 5 <210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 10 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 43
 Ser Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 15 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 20 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 44
 His Asp Asp Ser Pro Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 25 <210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 45
 Leu Ala Gly Glu Asp Ile Ser Asn Val Leu Ala

	1		5		10
	<210>	46			
	<211>	7			
	<212>	PRT			
5	<213>	Sequência Artificial			
	<220>				
	<223>	Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético			
	<400>	46			
	Ala Ala Asn Arg Leu Gln Asp				
10	1		5		
	<210>	47			
	<211>	9			
	<212>	PRT			
	<213>	Sequência Artificial			
15	<220>				
	<223>	Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético			
	<400>	47			
	Gln Gln Thr Phe Arg Tyr Pro Leu Thr				
	1		5		
20	<210>	48			
	<211>	10			
	<212>	PRT			
	<213>	Sequência Artificial			
	<220>				
25	<223>	Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético			
	<400>	48			
	Gly Phe Ser Leu Thr Ser His His Ile Ser				
	1		5		10
	<210>	49			
30	<211>	16			
	<212>	PRT			
	<213>	Sequência Artificial			

<220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 49
 Val Met Trp Asn Asp Gly Gly Thr Leu Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 5 1 5 10 15
 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 10 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 50
 Gly Lys Met His Tyr Tyr Val Leu Asp Ala
 15 1 5 10
 <210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 20 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 51
 Arg Thr Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 1 5 10
 25 <210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência Artificial: Peptídeo sintético
 <400> 52
 Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp


```

<210>      55
<211>      321
<212>      DNA
<213>      Sequência Artificial
5  <220>
<223>      Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo
          sintético
<400>      55
gacatccaga tgacacagtc tccaacttcc ctgtctgcat ctctcggaga aactgtctcc   60
10 atcgaatgtc tagcaggtga agacatttcc aatgttttag cgtggtatca gcagaagtca   120
   ggggggtctc ctcagctcct gatctatgct gcaaataggt tacaagacgg ggtcccctca   180
   cggttcagtg gcagtggatc tggcacacgg tattctctca agatcagtg   catgcgacct   240
   gaagatgaag cagattattt ctgtcaacag actttcaggt atccgctcac gttcggttct   300
   gggaccaagc tgggaattgaa a                                     321
15 <210>      56
<211>      119
<212>      PRT
<213>      Sequência Artificial
<220>
20 <223>      Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
          tético
<400>      56
Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
25 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
           20           25           30
   Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
   Ala Ser Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
30           50           55           60
   Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ile Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65           70           75           80

```


Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Arg Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 5 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Ser Asn Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Asp Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 10 100 105
 <210> 59
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo
 sintético
 <400> 59
 gacatccaga tgacacagtc tccggcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtcacc 60
 20 atcgaatgtc gaacaagtga ggacatttac agtaatttag cgtggtatcg gcagagacca 120
 gggaaagtctc ctcagctcct gatctatgat acaaatagat tggctgatgg ggtcccgta 180
 cggttcagtg gcagtggatc tggcacacaa tattctctaa agataaacag cctgcaatct 240
 gaagatgtcg ccagctattt ctgtcaacac tatagcaatt ttccgtggac cttcgggtgga 300
 gacaccaagc tggaattgaa a 321
 25 <210> 60
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
 tético
 <400> 60

Gln Val Gln Leu Thr Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser His
 20 25 30
 5 His Ile Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Val Met Trp Asn Asp Gly Gly Thr Leu Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Pro Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 10 65 70 75 80
 Lys Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Lys Met His Tyr Tyr Val Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ala
 100 105 110
 15 Ser Val Thr Val Ser
 115
 <210> 61
 <211> 351
 <212> DNA
 20 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo
 sintético
 <400> 61
 25 caggtgcagc tgacggagtc agggcctggc ctggtgcagc cctcacagac cctgtctctc 60
 acctgcactg tctctggggt ctcattaacc agccatcata tatcctgggt tcgacagcct 120
 ccaggaaaag gtctggagtg ggtgggagtc atgtggaatg atggaggcac attatataat 180
 tcagctctca agtctcgacc gagcatcagt agggacacct ccaagagtca ggtcttctta 240
 aaaatgagca gtctgcaaac tgaagacaca gccacttact actgtgccag gggcaaaatg 300
 30 cactactatg ttctggatgc ctggggtaa ggagcttcag tcactgtctc g 351
 <210> 62
 <211> 238

<212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
 5 tético
 <400> 62
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 10 20 25 30
 Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg
 35 40 45
 Val Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 15 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 100 105 110
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 25 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 30 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 5 <210> 63
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 10 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
 tético
 <400> 63
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 15 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 20 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 25 Glu Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 30 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

<400> 65

5 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe
 10 35 40 45
 Thr Ser Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Asp Thr Asn Phe Asn
 65 70 75 80
 15 Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Asp Gly Arg Asn Asp Met Asp Ser Trp Gly
 20 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 25 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 30 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 245 250 255
 5 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 275 280 285
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 10 290 295 300
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335
 15 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 340 345 350
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 20 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415
 25 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 30 450 455 460
 <210> 66
 <211> 444

<212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
 5 tético
 <400> 66
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
 10 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Asp Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 15 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Asp Gly Arg Asn Asp Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 20 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 25 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 30 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 5 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 10 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 15 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 20 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 25 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 30 435 440
 <210> 67
 <211> 1392

<212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo
 5 sintético
 <400> 67
 atggactgga cctggagggt cttctgcttg ctggctgtag caccaggtgc ccactcccag 60
 gtccaactgg tgcagtcagg ggctgaagtg gtgaagcctg gggcttcagt gaagttgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacat cttcaccagt tattatatgt actgggtgaa gcaggcgccc 180
 10 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca atggtgatac taacttcaat 240
 gagaagttca agagtaaggc cacactgact gtagacaaat ccgccagcac agcatacatg 300
 gagctcagca gcctgaggtc tgaggacact gcggtctatt actgtacaag atcggacggt 360
 agaaatgata tggactcctg gggccaaggg accctggcca ccgtctctc agcttccacc 420
 aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagat ctacctcga gagcacagcc 480
 15 gccctgggct gcctggtaaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720
 ccccatgcc caccgtgcc agcacctgag ttcttggggg gaccatcagt cttctgttc 780
 20 ccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac gtgctggtg 840
 gtggacgtga gccaggaaga ccccgagtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcgcgta ccgtgtggtc 960
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtaca gtgcaaggtc 1020
 tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
 25 cgagagccac aagtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140
 agcctgacct gcctggtaaa aggttcttac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tcctcgattc cgacggctcc 1260
 ttcttctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1320
 tcatgctccg tgatgatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1380
 30 tctctggggt ga 1392
 <210> 68
 <211> 236

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

5

<400> 68

	Met	Asp	Met	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp
	1			5					10					15		
	Leu	Arg	Gly	Ala	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser
10			20					25						30		
	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser
			35					40					45			
	Glu	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Arg	Lys	Pro	Gly	Lys
		50					55					60				
15	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Tyr	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Val
	65					70					75				80	
	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr
				85						90					95	
	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
20				100					105					110		
	Tyr	Tyr	Lys	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
			115					120					125			
	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp
			130					135				140				
25	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn
	145					150						155			160	
	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu
				165					170						175	
	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp
30				180					185					190		
	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr
				195					200					205		

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 5 <210> 69
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 10 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
 tético
 <400> 69
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Leu Tyr Tyr Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Thr Tyr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 20 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Lys Phe Pro Phe
 85 90 95
 25 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 30 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
		165 170 175
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
		180 185 190
5	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
		195 200 205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
		210
	<210>	70
10	<211>	711
	<212>	DNA
	<213>	Sequência Artificial
	<220>	
	<223>	Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo
15		sintético
	<400>	70
	atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc	60
	agatgtgata tccagatgac ccagagtcca agcagtctct ccgccagcgt aggcgatcgt	120
	gtgactatta cctgtcgtgc cagtgaggac ctctattaca acctggcctg gtatcagcgt	180
20	aaaccgggca aagccccgaa gctgctcatc tatgatacgt accgcctggc tgacgggtgtg	240
	ccaagccgtt tcagtggcag tggcagcggg actgactata ccctcacaat ttcgtctctc	300
	cagccggaag atttcgctc ttactattgt cagcaatatt acaagttccc tttcaccttc	360
	ggtcagggca ctaaagtaga aatcaaacgt acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc	420
	ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	480
25	ttctatccca gagaggcaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac	540
	tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	600
	ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	660
	cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta g	711
	<210>	71
30	<211>	463
	<212>	PRT
	<213>	Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sintético

<400> 71

5 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser
 10 35 40 45
 Thr Asn Tyr His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser
 65 70 75 80
 15 Val Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 85 90 95
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly
 20 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 25 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 30 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 245 250 255
 5 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 275 280 285
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 10 290 295 300
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335
 15 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 340 345 350
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 20 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415
 25 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 30 450 455 460
 <210> 72
 <211> 444

<212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
 5 tético
 <400> 72
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr
 10 20 25 30
 His Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60
 15 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
 20 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 25 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 30 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 5 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 10 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 15 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 20 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 25 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 30 435 440
 <210> 73
 <211> 1392

<212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polinucleotídeo sintético
 5 <400> 73
 atggactgga cctggaggggt cttctgcttg ctggctgtag caccaggtgc ccactccgaa 60
 gtacaattgg tcgagtctgg aggcgggctt gtccagcctg gtgggagcct gcgtctctct 120
 tgtgcagtga gcggcttcag ctctaccaat taccatgtgc actgggtgcg tcaggcacct 180
 10 ggggaagggcc tggagtggat ggggtttatt tggggcgacg gcgatacatc ctacaactcc 240
 gtcctgaaga gccgtttcac catttcccgt gacacctcaa agaataaccgt ttacctccag 300
 atgaactctc tccgcgcaga ggacacagca gtctattact gtgcacgtca actgaccac 360
 tattacgttt tggcagcctg gggcaaggg actctgggtca cagtctcgag cgcttcaacc 420
 aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagat ctacctcga gagcacagcc 480
 15 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 540
 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttg gacacgaagac ctacacctgc 660
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720
 ccccatgcc caccgtgccc agcacctgag ttctctggggg gaccatcagt ctctctgttc 780
 20 ccccaaaaac ccaaggacac tctcatgac tcccggacc ctgagggtcac gtgcgtgggtg 840
 gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcgcgta ccgtgtgggtc 960
 agcgtcctca ccgtctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaagggtc 1020
 tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
 25 cgagagccac aagtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140
 agcctgacct gcctgggtcaa aggccttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tctctgattc cgacggctcc 1260
 ttcttctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1320
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1380
 30 tctctggggt ga 1392
 <210> 74
 <211> 117

<212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
 5 tético
 <400> 74
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr
 10 20 25 30
 His Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60
 15 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
 20 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser
 115
 <210> 75
 <211> 117
 25 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Polipeptídeo sin-
 tético
 30 <400> 75
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30
 His Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 5 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 10 85 90 95
 Arg Gln Leu Thr His Tyr Tyr Val Leu Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser
 115
 15 <210> 76
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 76
 20 Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser
 1 5 10 15
 Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr
 20 25 30
 Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val
 25 35 40 45
 Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser
 50 55 60
 Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu
 65 70 75 80
 30 Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr
 85 90 95
 His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly

100 105 110
 Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp
 115 120 125
 Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu
 5 130 135 140
 Lys Leu
 145
 <210> 77
 <211> 146
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 77
 Gly Asp Glu Asp Pro Gln Ile Ala Ala His Val Val Ser Glu Ala Asn
 1 5 10 15
 15 Ser Asn Ala Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr
 20 25 30
 Met Lys Ser Asn Leu Val Met Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val
 35 40 45
 Lys Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Thr Gln Val Thr Phe Cys Ser
 20 50 55 60
 Asn Arg Glu Pro Ser Ser Gln Arg Pro Phe Ile Val Gly Leu Trp Leu
 65 70 75 80
 Lys Pro Ser Ser Gly Ser Glu Arg Ile Leu Leu Lys Ala Ala Asn Thr
 85 90 95
 25 His Ser Ser Ser Gln Leu Cys Glu Gln Gln Ser Val His Leu Gly Gly
 100 105 110
 Val Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Glu
 115 120 125
 Ala Ser Gln Val Ile His Arg Val Gly Phe Ser Ser Phe Gly Leu Leu
 30 130 135 140
 Lys Leu
 145