



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0309730-7 B1



(22) Data do Depósito: 02/05/2003

(45) Data de Concessão: 04/05/2021

(54) Título: MOLÉCULA DE ANTICORPO POSSUINDO ESPECIFICIDADE PARA CD22 HUMANA, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE EXPRESSÃO OU CLONAGEM, CÉLULA HOSPEDEIRA, USO DA MOLÉCULA DE ANTICORPO OU DA SEQUÊNCIA DE DNA, COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA OU TERAPÊUTICA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE ANTICORPO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA OU TERAPÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 02/05/2002 GB 0210121.0.

(73) Titular(es): UCB PHARMA SA.

(72) Inventor(es): ANDREW GEORGE POPPLEWELL; SIMON PETER TICKLE; HEATHER MARGARET LADYMAN.

(86) Pedido PCT: PCT GB2003093320 de 02/05/2003

(87) Publicação PCT: WO 2003/093320 de 13/11/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/10/2004

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ANTICORPO, VARIANTE DESTA, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE EXPRESSÃO ou CLONAGEM, CÉLULA HOSPEDEIRA, USO DA MOLÉCULA DE ANTICORPO OU DA SEQUÊNCIA DE DNA, COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA OU TERAPÊUTICA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE ANTICORPO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA OU TERAPÊUTICA, E, POLIPEPTÍDEO. São descritas moléculas de anticorpo contendo pelo menos uma CDR derivada de um anticorpo monoclonal de camundongo possuindo especificidade para CD22 humana. Também é descrito um anticorpo enxertado com CDR no qual pelo menos uma das CDRs é uma CDR modificada. São adicionalmente descritas sequências de DNA codificadoras de cadeias de moléculas de anticorpo, vetores, células hospedeiras transformadas e usos das moléculas de anticorpo no tratamento de doenças mediadas por células expressando CD22.

“MOLÉCULA DE ANTICORPO POSSUINDO ESPECIFICIDADE PARA CD22 HUMANA, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE EXPRESSÃO OU CLONAGEM, CÉLULA HOSPEDEIRA, USO DA MOLÉCULA DE ANTICORPO OU DA SEQUÊNCIA DE DNA, COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA OU TERAPÊUTICA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE ANTICORPO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DIAGNÓSTICA OU TERAPÊUTICA”

[0001] A presente invenção refere-se a uma molécula de anticorpo possuindo especificidade para determinantes antigênicos do antígeno de linfócito B, CD22. A presente invenção também refere-se aos usos terapêuticos da molécula de anticorpo e aos métodos para a produção da molécula de anticorpo.

[0002] Em uma molécula de anticorpo natural, há duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Cada cadeia pesada e cada cadeia leve possui em sua extremidade N-terminal um domínio variável. Cada domínio variável é composto de quatro regiões estruturais (FRs, framework regions) alternando com três regiões determinantes de complementaridade (CDRs, complementarity determining regions). Os resíduos nos domínios variáveis são convencionalmente numerados de acordo com um sistema desenvolvido por Kabat et al. Este sistema é descrito em Kabat et al., 1987, em "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services, NIH, USA (daqui por diante "Kabat et al. (supra)"). Este sistema de numeração é usado no presente relatório descritivo exceto onde indicado de outro modo.

[0003] As designações de resíduo de Kabat nem sempre correspondem diretamente à numeração linear dos resíduos de aminoácido. A sequência de aminoácidos linear real pode conter menos ou mais aminoácidos do que na estrita numeração de Kabat correspondendo a um encurtamento de, ou inserção em, um componente estrutural, seja região de molde seja CDR, da estrutura de domínio variável básica. A numeração de Kabat correta de resíduos pode ser determinada para um dado anticorpo pelo alinhamento dos resíduos de homologia na sequência do anticorpo com uma sequência numerada de Kabat "padrão".

[0004] As CDRs do domínio de variável de cadeia pesada estão localizadas em resíduos 31-35 (CDR-H1), resíduos 50-65 (CDR-H2) e resíduos 95-102 (CDR-H3) de acordo com a numeração de Kabat.

[0005] As CDRs do domínio variável de cadeia leve estão localizadas em resíduos 24-34 (CDR-L1), resíduos 50-56 (CDR-L2) e resíduos 89-97 (CDR-L3) de acordo com a numeração de Kabat.

[0006] Construção de anticorpos enxertados com CDR é descrita no Pedido de Patente Européia EP-A-0239400, que descreve um processo no qual as CDRs de um anticorpo monoclonal de camundongo são enxertadas nas regiões estruturais dos domínios variáveis de uma imunoglobulina humana por mutagênese sítio-direcionada usando oligonucleotídeos longos. As CDRs determinam a especificidade de ligação de antígeno dos anticorpos e são sequências de peptídeo relativamente curtas transportadas sobre as regiões estruturais dos domínios variáveis.

[0007] O trabalho inicial sobre a humanização de anticorpos monoclonais pelo enxerto de CDR foi realizado sobre anticorpos monoclonais reconhecedores de antígenos sintéticos, tal como NP. Contudo, exemplos nos quais um anticorpo monoclonal de camundongo reconhecedor de lisozima e um anticorpo monoclonal de rato reconhecedor de um antígeno sobre células T humanas foram humanizados por enxerto de CDR têm sido descritos por Vehoeyen et al. (Science, 239, 1534-1536, 1988) e por Riechmann et al. (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente.

[0008] Riechmann et al., verificaram que a transferência de CDRs sozinhas (como definido por Kabat (Kabat et al. (supra)) e Wu et al., J. Exp. Med, 132, 211-250, 1970)) não foi suficiente para se proporcionar atividade de ligação de antígeno satisfatória no produto enxertado com CDR. Foi verificado que numerosos resíduos de região de molde têm que ser alterados de modo que correspondam àqueles da região de molde doadora. Critérios propostos para seleção quais resíduos de região de molde necessitam ser alterados são descritos no Pedido de Patente Internacional WO 90/07861.

[0009] Numerosas revisões discutindo anticorpos enxertado com CDRs têm sido publicadas, incluindo Vaughan et al. (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

[0010] Linfomas malignos são um grupo diverso de neoplasmas. A maioria dos casos ocorre em pessoas mais velhas. Linfoma de Não-Hodgkins (NHL) é uma doença que correntemente afeta 200.000 a 250.000 pacientes nos Estados Unidos. É o segundo câncer de crescimento mais rápido nos Estados Unidos, crescendo a uma taxa de cerca de 55.000 casos novos por ano. A incidência está crescendo a uma taxa que é maior do que a que pode ser responsável simplesmente pelo aumento da idade da população e exposição aos fatores de risco conhecidos.

[0011] A classificação de linfoma é complexa, e tem evoluído em décadas recentes. Em 1994 foi introduzida a classificação de Revised European-American Lymphoma (REAL). Esta classificação organiza os linfomas de célula B (a mais freqüentemente identificada), de célula T e de origem não classificável em subtipos acordados. Na prática diária, o agrupamento de NHLs em categorias de graus baixo, intermediário e alto na base de aparência histológica geral deles, reflete amplamente seu comportamento clínico.

[0012] NHL predominantemente afeta os linfonodos mas, em pacientes individuais, o tumor pode envolver outros sítios tais como o fígado, o baço, a medula óssea, os pulmões, o intestino e a pele. A doença comumente apresenta-se como um alargamento indolor dos linfonodos. Linfoma extranodal mais freqüentemente afeta o intestino, embora linfoma primário de virtualmente cada órgão tenha sido documentado. Sintomas sistêmicos incluem febre, sudorese, fadiga e perda de peso.

[0013] Até recentemente, o sistema de estadiamento de Ann Arbor, baseado inteiramente na extensão anatômica da doença, foi o determinante principal de terapia em NHL. Esta informação pode ser refinada pela incorporação de apontadores de prognóstico adicionais, incluindo a idade, os níveis de lactato-desidrogenase sérica e o estado de desempenho. Mesmo assim, o conhecimento do sistema de estadiamento de Ann Arbor, junto com o subtipo histológico e imunológico do tumor, ainda é o determinante principal do tratamento.

[0014] NHL de grau baixo possui um curso indolente, com uma sobrevivência média do paciente de 8 a 10 anos. Sobrevivência é pouco impactada pela terapia correntemente disponível, embora irradiação da doença local e quimioterapia para

sintomas sistêmicos melhorem a qualidade de vida do paciente. Quimioterapia de combinação pode ser reservada para recaída na doença. Doença intermediária e, especificamente, doença de grau alto é extremamente agressiva e tende a se disseminar. Doença deste grau requer tratamento urgente. Radioterapia pode ser um componente útil do tratamento em pacientes com doença muito volumosa. Muitos regimes de quimioterapia diferentes têm sido empregados, e sobrevivência livre de doença de longa duração pode ser obtida em mais do que a metade dos pacientes. Terapia de dose alta com suporte de célula-tronco foi introduzida inicialmente para pacientes com recaída na doença ou doença refratária, mas está agora encontrando um lugar cada vez maior em terapia de primeira linha para pacientes com doença de risco baixo. A tendência em anos recentes para uma abordagem terapêutica crescentemente agressiva tem sido balanceada contra a idade geralmente idosa e a debilidade relativa de muitos pacientes com NHL, e pela necessidade de se combinar a toxicidade de tratamento com o prognóstico individual de cada doença de paciente.

[0015] Tratamentos melhorados, que são mais efetivos e melhor tolerados, são necessários. Agentes recentemente introduzidos incluem novas drogas citotóxicas, progressivamente incorporadas em combinações, e a introdução de terapias baseadas em anticorpo.

[0016] Linfoma de Não-Hodgkin inclui uma variedade de linfomas de célula B. Antígenos de célula B portanto representam alvos adequados para terapia de anticorpo.

[0017] CD22 é uma glicoproteína de membrana de 135 kDa pertencente a uma família de proteínas ligadoras de ácido silícico chamadas de sialoadesinas. É detectada no citoplasma primeiro em desenvolvimento de célula B, parece sobre a superfície de célula B simultaneamente com IgD e é verificada sobre células B mais maduras. Expressão é aumentada após ativação de célula B. CD22 é perdida com diferenciação terminal e é em geral relatada em estar ausente sobre células plasmáticas. Assim este antígeno de internalização está presente sobre a superfície de pré-células B e de células B maduras mas não sobre células-tronco ou células

plasmáticas.

[0018] Duas isoformas de CD22 existem no homem. A forma predominante (CD22 β) contém 7 domínios imunoglobulina-semelhantes (Ig-semelhantes) na região extracelular. A variante CD22 α é faltante de domínio 4 Ig-semelhante e possui um domínio citoplásmico truncado. Tem sido mostrado que anticorpos que bloqueiam a adesão de CD22 em monócitos, neutrófilos, linfócitos e eritrócitos se ligam dentro do primeiro ou segundo domínio Ig-semelhante.

[0019] O domínio citoplásmico de CD22 é tirosina-fosforilado sob ligação do receptor de antígeno de célula B e associa-se com L γ k, Syk e fosfatidil-inositol-3-quinase. A função de CD22 é para infra-modular o limite de ativação de célula B. Também pode mediar a adesão celular por intermédio de interação com células possuindo os sialoglicoconjugados apropriados.

[0020] CD22 é expressada na maioria de linfomas e leucemias de célula B, incluindo NHL, leucemia linfoblástica aguda (B-ALL), leucemia linfocítica crônica (B-CLL) e especialmente leucemia não-linfocítica aguda (ANLL).

[0021] Anticorpos monoclonais contra CD22 têm sido descritos na arte anterior. WO 98/41641 descreve anticorpos anti-CD22 recombinantes com resíduos de cisteína em V_H44 e V_L100. WO 96/04925 descreve as regiões V_H e V_L de anticorpo LL2 anti-CD22. US 5686072 descreve combinações de imunotoxinas anti-CD22 e anti-CD19. WO 98/42378 descreve o uso de anticorpos anti-CD22 nus para o tratamento de malignidades de célula B.

[0022] Numerosas terapias baseadas em anticorpo têm sido quer recentemente licenciadas, por exemplo Rituxan (um γ 1 quimérico não marcado (região +m γ 1V) específico para CD20), quer estão em testes clínicos para esta doença. Estas contam com matança de célula B complemento- ou ADCC-mediada ou com o uso de radionuclídeos, tal como ¹³¹I ou ⁹⁰Y, que têm preparação associada e problemas de uso para clínicos e pacientes. Há uma necessidade de uma molécula de anticorpo para tratar NHL que possa ser usada repetidamente e produzida fácil e eficientemente. Também há uma necessidade de uma molécula de anticorpo, que possua alta afinidade por CD22 e baixa imunogenicidade em humanos.

[0023] Sumário da invenção

[0024] Em um primeiro aspecto, a presente invenção proporciona uma molécula de anticorpo possuindo especificidade para CD22 humana, compreendendo uma cadeia pesada na qual o domínio variável compreende uma CDR (como definida por Kabat et al., (supra)) possuindo a sequência dada como H1 na Figura 1 (SEQ ID NO: 1) para CDR-H1, como H2 na Figura 1 (SEQ ID NO: 2) ou uma H2 da qual um sítio de glicosilação potencial tem sido removido, ou uma H2 na qual o resíduo lisina na posição 60 (de acordo com o sistema de numeração de Kabat) tem sido substituído por um aminoácido alternativo, ou uma H2 na qual ambos o sítio de glicosilação e a lisina reativa na posição 60 têm sido removidos para CDR-H2 ou como H2 na Figura 1 (SEQ ID NO: 3) para CDR-H3.

[0025] A molécula de anticorpo do primeiro aspecto da presente invenção compreende pelo menos uma CDR selecionada de H1, H2 e H3 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, e SEQ ID NO: 3) para o domínio variável de cadeia pesada. Preferivelmente, a molécula de anticorpo compreende pelo menos duas e com maior preferência todas as três CDRs no domínio variável de cadeia pesada.

[0026] Em um segundo aspecto da presente invenção, é proporcionada uma molécula de anticorpo possuindo especificidade para CD22 humana, compreendendo uma cadeia leve na qual o domínio variável compreende uma CDR (como definida por Kabat et al. (supra)) possuindo a sequência dada como L1 na Figura 1 (SEQ ID NO: 4) para CDR-L1, L2 na Figura 1 (SEQ ID NO: 5) para CDR-L2 ou L3 na Figura 1 (SEQ ID NO: 6) para CDR-L3.

[0027] A molécula de anticorpo do segundo aspecto da presente invenção compreende pelo menos uma CDR selecionada de L1, L2 e L3 (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6) para o domínio variável de cadeia leve. Preferivelmente, a molécula de anticorpo compreende pelo menos duas e com maior preferência todas as três CDRs no domínio variável de cadeia leve.

[0028] As moléculas de anticorpo dos primeiro e segundo aspectos da presente invenção preferivelmente possuem uma cadeia leve complementar ou uma cadeia pesada complementar, respectivamente.

[0029] Preferivelmente, a molécula de anticorpo do primeiro ou segundo aspecto da presente invenção compreende uma cadeia pesada na qual o domínio variável compreende uma CDR (como definida por Kabat et al. (supra)) possuindo a sequência dada como H1 na Figura 1 (SEQ ID NO: 1) para CDR-H1, como H2 na Figura 1 (SEQ ID NO: 2) ou uma H2 da qual um sítio de glicosilação potencial tem sido removido, ou uma H2 na qual o resíduo lisina na posição 60 (de acordo com o sistema de numeração de Kabat) tem sido substituído por um aminoácido alternativo, ou uma H2 na qual ambos o sítio de glicosilação e a lisina reativa na posição 60 têm sido removidos para CDR-H2 ou como H2 na Figura 1 (SEQ ID NO: 3) para CDR-H3 e uma cadeia leve na qual o domínio variável compreende uma CDR (como definida por Kabat et al. (supra)) possuindo a sequência dada como L1 na Figura 1 (SEQ ID NO: 4) para CDR-L1, como L2 na Figura 1 (SEQ ID NO: 5) para CDR-L2 ou como L3 na Figura 1 (SEQ ID NO: 6) para CDR-L3.

[0030] As CDRs dadas nas SEQ IDS NOS: 1 a 6 e na Figura 1 referidas acima são derivadas de um anticorpo monoclonal de camundongo 5/44.

[0031] As sequências completas dos domínios variáveis do anticorpo 5/44 de camundongo são mostradas na Figura 2 (cadeia leve) (SEQ ID NO: 7) e na Figura 3 (cadeia pesada) (SEQ ID NO: 8). Este anticorpo de camundongo também é referido abaixo como "o anticorpo doador" ou o "anticorpo monoclonal murino".

[0032] Uma primeira modalidade alternativamente preferida do primeiro ou segundo aspecto da presente invenção é o anticorpo monoclonal de camundongo 5/44 possuindo as sequências de domínios variáveis de cadeias leve e pesada mostradas na Figura 2 (SEQ ID NO: 7) e na Figura 3 (SEQ ID NO: 8), respectivamente. A região constante de cadeia leve de 5/44 é kappa e a região constante de cadeia pesada é IgG1.

[0033] Em uma segunda modalidade alternativamente preferida, o anticorpo de acordo quer com o primeiro quer com o segundo aspecto da presente invenção é uma molécula de anticorpo de humano/de camundongo quimérica, aqui referida como a molécula de anticorpo 5/44 quimérica. A molécula de anticorpo quimérica compreende os domínios variáveis de anticorpo monoclonal de camundongo 5/44

(SEQ ID NOS: 7 e 8) e os domínios constantes humanos. Preferivelmente, a molécula de anticorpo 5/44 quimérica compreende o domínio kappa C humano (Hieter et al., Cell, 22, 197-207, 1980; número de acesso no Genebank J00241) na cadeia leve e os domínios gama 4 humanos (Flanagan et al., Nature, 300, 709-713, 1982) na cadeia leve, opcionalmente com o resíduo de serina na posição 241 substituído por um resíduo de prolina.

[0034] Preferivelmente, o anticorpo da presente invenção compreende uma cadeia pesada na qual o domínio variável compreende como CDR-H2 (como definida por Kabat et al. (supra)) uma H2' na qual uma sequência de sítio de glicosilação potencial tem sido removida e que surpreendentemente aumentou a afinidade do anticorpo 5/44 quimérico pelo antígeno CD22 e que preferivelmente possui como CDR-H2 a sequência dada como H2' (SEQ ID NO: 13).

[0035] Alternativa ou adicionalmente, o anticorpo da presente invenção pode compreender uma cadeia pesada na qual o domínio variável compreende como CDR-H2 (como definida por Kabat et al. (supra)) uma H2" na qual um resíduo de lisina na posição 60, que está localizado em uma posição exposta dentro de CDR-H2 e que é considerado em possuir o potencial de reagir com agentes de conjugação resultando em uma redução da finidade de ligação de antígeno, é substituído por um aminoácido alternativo para resultar em uma substituição conservada. Preferivelmente CDR-H2 possui a sequência dada como H2" (SEQ ID NO: 15).

[0036] Alternativa ou adicionalmente, o anticorpo da presente invenção pode compreender uma cadeia pesada na qual o domínio variável compreende como CDR-H2 (como definida por Kabat et al. (supra)) uma H2'" na qual tanto o sítio de glicosilação potencial quanto o resíduo de glicina na posição 60, são substituídos por aminoácidos alternativos. Preferivelmente CDR-H2 possui a sequência dada como H2'" (SEQ ID NO: 16).

[0037] Em uma terceira modalidade alternativamente preferida, o anticorpo de acordo com qualquer um dos primeiro e segundo aspectos da presente invenção é uma molécula de anticorpo enxertada com CDR. O termo "uma molécula de

anticorpo enxertada com CDR" como aqui usado refere-se a uma molécula de anticorpo na qual a cadeia pesada e/ou leve contém uma ou mais CDRs (incluindo, se desejada, uma CDR modificada) de um anticorpo doador (por exemplo, um anticorpo monoclonal murino) enxertado em uma região de molde variável de cadeia leve e/ou pesada de um anticorpo aceptor (por exemplo um anticorpo humano).

[0038] Preferivelmente, um tal anticorpo enxertado com CDR possui um domínio variável compreendendo regiões estruturais acceptoras humanas bem como uma ou mais da CDRs doadoras referidas acima.

[0039] Quando as CDRs são enxertadas, qualquer sequência de região de molde variável acceptora apropriada pode ser usada possuindo relação com a classe/o tipo de anticorpo doador do qual as CDRs são derivadas, incluindo regiões estruturais de humano, de primata e de camundongo. Exemplos de regiões estruturais humanas que podem ser utilizadas na presente invenção são KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY e POM (Kabat et al. (supra)). Por exemplo, KOL e NEWM podem ser usadas para a cadeia pesada, REI pode ser usada para a cadeia leve e EU, LAY e POM podem ser usadas para ambas a cadeia leve e a cadeia pesada. Alternativamente, sequências de linhagem germinativa humanas podem ser utilizadas. A região de molde preferida para a cadeia leve é a sequência de sub-grupo de linhagem germinativa humana (DPK9+JK1) mostrada na Figura 5 (SEQ ID NO: 17). A região de molde preferida para a cadeia pesada é a sequência de sub-grupo humano (DP7+JH4) mostrada na Figura 6 (SEQ ID NO: 21).

[0040] Em um anticorpo enxertado com CDR da presente invenção, é preferido o uso como o anticorpo aceptor de um possuindo cadeias que são homólogas às cadeias do anticorpo doador. As cadeias leve e pesada acceptoras não necessariamente precisam ser derivadas do mesmo anticorpo e podem, se desejado, compreender cadeias compósitas possuindo regiões estruturais derivadas de cadeias diferentes.

[0041] Também, em um anticorpo enxertado com CDR da presente invenção, as regiões estruturais não precisam possuir exatamente a mesma sequência que aquelas do anticorpo aceptor. Por exemplo, resíduos incomuns podem ser mudados

para resíduos de ocorrência mais comum para aquela classe ou aquele tipo de cadeia aceptora. Alternativamente, resíduos selecionados nas regiões estruturais aceptoras podem ser mudados de modo que correspondam ao resíduo encontrado na mesma posição no anticorpo doador ou a um resíduo que é uma substituição conservativa para o resíduo encontrado na mesma posição no anticorpo doador. Tais mudanças devem ser mantidas no mínimo necessário para se recuperar a afinidade do anticorpo doador. Um protocolo para a seleção de resíduos nas regiões estruturais aceptoras que podem precisar ser mudados é descrito em WO 91/09967.

[0042] Preferivelmente, em uma molécula de anticorpo enxertada com CDR de acordo com a presente invenção, se a cadeia leve aceptora possuir o sub-grupo humano DPK9+JK1 (mostrado na Figura 5) (SEQ ID NO: 17 (DPK9) e SEQ ID NO: 18 (JK1)) então as regiões estruturais aceptoras da cadeia leve compreenderão resíduos doadores nas posições 2, 3, 37, 38, 45 e 60 e poderão compreender adicionalmente um resíduo doador na posição 3 (de acordo com Kabat et al., (supra)).

[0043] Preferivelmente, em uma molécula anticorpo enxertada com CDR da presente invenção, se a cadeia pesada aceptora possuir a sequência humana DP7+JH4 (mostrada na Figura 6) (SEQ ID NO: 21 (DP7) e SEQ ID NO: 22 (JH4)), então as regiões estruturais aceptoras da cadeia pesada compreenderão, em adição a uma ou mais CDRs doadoras, resíduos doadores nas posições 1, 28, 48, 71 e 93 e poderão compreender adicionalmente resíduos nas posições 67 e 69 (de acordo com Kabat et al., (supra)).

[0044] Resíduos doadores são resíduos do anticorpo doador, isto é o anticorpo do qual as CDRs foram originalmente derivadas.

[0045] Preferivelmente, o anticorpo da presente invenção compreende uma cadeia pesada na qual o domínio variável compreende como CDR-H2 ((como definida por Kabat et al. (supra)) uma H2' na qual um sítio de glicosilação potencial tem sido removido com o propósito de se aumentar a afinidade do anticorpo 5/44 quimérico pelo antígeno CD22 e que preferivelmente possui como CDR-H2 a sequência dada como H2' (SEQ ID NO: 13).

[0046] Alternativa ou adicionalmente, o anticorpo da presente invenção pode compreender uma cadeia pesada na qual o domínio variável compreende como CDR-H2 (como definida por Kabat et al. (supra)) uma H2" na qual um resíduo de lisina na posição 60, que está localizado em uma posição exposta dentro de CDR-H2 e que é considerado em possuir o potencial para reagir com agentes de conjugação resultando em uma redução da afinidade de ligação por antígeno, é substituído por um aminoácido alternativo. Preferivelmente CDR-H2 possui a sequência dada como H2" (SEQ ID NO: 15).

[0047] Alternativa ou adicionalmente, o anticorpo da presente invenção pode compreender uma cadeia pesada na qual o domínio variável compreende como CDR-H2 (como definida por Kabat et al. (supra)) uma H2'" na qual tanto a sequência do sítio de glicosilação potencial quanto o resíduo de lisina na posição 60, são substituídos por aminoácidos alternativos. Preferivelmente CDR-H2 possui a sequência dada como H2'" (SEQ ID NO: 16).

[0048] A molécula de anticorpo da presente invenção pode compreender: uma molécula de anticorpo completa, possuindo cadeias leve e pesada de comprimento total; um seu fragmento, tal como fragmento Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂ ou Fv; um monômero ou dímero de cadeia pesada ou de cadeia leve; um anticorpo de cadeia única, por exemplo Fv de cadeia única no qual os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada são unidos por um ligador peptídico. Semelhantemente, as regiões variáveis de cadeia leve e pesada podem ser combinadas com outros domínios de anticorpo se apropriado.

[0049] A molécula de anticorpo da presente invenção pode possuir uma molécula repórter ou efetora ligada na mesma. Por exemplo, pode possuir um macrociclo, para quelar um átomo de metal pesado, ou uma toxina, tal como ricina, ligada na mesma por uma estrutura de ponte covalente. Alternativamente, procedimentos de tecnologia de DNA recombinante podem ser utilizados para se produzir uma molécula de anticorpo na qual o fragmento Fc (domínios de dobradiça, CH2 e CH3), os domínios CH2 e CH3 ou o domínio CH3 de uma molécula de

imunoglobulina completa tem (têm) sido substituído(s) por, ou tem (têm) sido ligado na mesma por ligação peptídica, uma proteína de não-imunoglobulina funcional, tal como uma molécula de toxina ou de enzima.

[0050] A molécula de anticorpo da presente invenção preferivelmente possui uma afinidade de ligação de pelo menos $0,85 \times 10^{-10}$ M, com maior preferência de pelo menos $0,75 \times 10^{-10}$ M e mais preferivelmente de pelo menos $0,5 \times 10^{-10}$ M.

[0051] Preferivelmente, a molécula de anticorpo da presente invenção compreende o domínio variável de cadeia leve 5/44-gL1 (SEQ ID NO: 19) e o domínio variável de cadeia pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO: 27). As sequências dos domínios variáveis destas cadeias leve e pesada são mostradas nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

[0052] A presente invenção também refere-se às variantes da molécula de anticorpo da presente invenção, que possuem uma afinidade melhorada por CD22. Tais variantes podem ser obtidas por numerosos protocolos de afinidade incluindo a mutação das CDRs (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), rearranjo de cadeia (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas de E. coli causadoras de mutação (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), rearranjo de DNA (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 724-733, 1997), exibição de fago (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) e PCR sexual (Crameri et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (supra) discute estes métodos de maturação de afinidade.

[0053] A presente invenção também proporciona uma sequência de DNA codificadora da(s) cadeia(s) leve e/ou pesada da molécula de anticorpo da presente invenção.

[0054] Preferivelmente, a sequência de DNA codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada da molécula de anticorpo da presente invenção.

[0055] A sequência de DNA da presente invenção pode compreender DNA sintético, por exemplo produzido por processamento químico, cDNA, DNA genômico ou qualquer combinação dos mesmos.

[0056] A presente invenção também refere-se a um vetor de expressão ou

clonagem compreendendo uma ou mais sequências de DNA da presente invenção. Preferivelmente, o vetor de expressão ou clonagem compreende duas sequências de DNA, codificadoras de cadeia leve ou de cadeia pesada da molécula de anticorpo da presente invenção.

[0057] Métodos gerais pelos quais os vetores podem ser construídos, métodos de transfecção e métodos de cultura são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte. Com respeito a estes, referência é feita a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York e o Maniatis Manual produzido por Cold Spring Harbor Publishing.

[0058] Sequências de DNA que codificam a molécula de anticorpo da presente invenção podem ser obtidas por métodos bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte. Por exemplo, as sequências codificadoras de parte das ou de todas as cadeia leve e pesada de anticorpo podem ser sintetizadas como desejado a partir de sequências de DNA determinadas ou baseando-se nas sequências de aminoácidos correspondentes.

[0059] DNA codificador de sequências região de molde acceptora está amplamente disponível para aquelas pessoas experientes na arte e pode ser prontamente sintetizado baseando-se em suas conhecidas sequências de aminoácidos.

[0060] Técnicas padrão de biologia molecular podem ser usadas para se prepararem sequências de DNA codificadoras da molécula de anticorpo da presente invenção. Sequências de DNA desejadas podem ser sintetizadas completamente ou em parte usando-se as técnicas de síntese de oligonucleotídeo. Técnicas de mutagênese sítio-direcionada e de reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser utilizadas se apropriadas.

[0061] Qualquer sistema de vetor / célula hospedeira adequado pode ser empregado para a expressão das sequências de DNA codificadoras da molécula de anticorpo da presente invenção. Sistemas bacterianos, por exemplo E. coli, e outros sistemas microbianos podem ser usados, em parte, para a expressão dos fragmentos de anticorpo tais como fragmentos Fab e F(ab')₂, e especialmente de

fragmentos Fv e fragmentos de anticorpo de cadeia única, por exemplo, FVs de cadeia única. Sistemas de expressão de célula hospedeira eucariótica, por exemplo, de mamífero, podem ser usados para a produção de moléculas de anticorpo maiores, incluindo moléculas de anticorpo completas. Células hospedeiras de mamífero adequadas incluem células CHO, de mieloma ou células de hibridoma.

[0062] A presente invenção também proporciona um processo para a produção de uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção compreendendo o cultivo de uma célula hospedeira contendo um vetor da presente invenção sob condições adequadas para dar a expressão de proteína a partir do DNA codificador da molécula de anticorpo da presente invenção, e o isolamento da molécula de anticorpo.

[0063] A molécula de anticorpo pode compreender apenas um polipeptídeo de cadeia leve ou pesada, em cujo caso apenas uma sequência de polipeptídeo de cadeia leve ou de cadeia pesada necessita ser usada para se transfectarem as células hospedeiras. Para a produção de produtos compreendendo ambas as cadeias leve e pesada, a linhagem celular pode ser transfectada com dois vetores, um primeiro vetor codificador de um polipeptídeo de cadeia leve e um segundo vetor codificador de um polipeptídeo de cadeia pesada. Alternativamente, um único vetor pode ser empregado, o vetor incluindo as sequências codificadoras de polipeptídeos de cadeia pesada e de cadeia leve.

[0064] A presente invenção também proporciona uma composição diagnóstica ou terapêutica compreendendo uma molécula de anticorpo da presente invenção em combinação com um carreador, excipiente ou diluente farmacologicamente aceitável.

[0065] A presente invenção também proporciona um processo para a preparação de uma composição diagnóstica ou terapêutica compreendendo a mistura da molécula de anticorpo da presente invenção com um carreador, excipiente ou diluente farmacologicamente aceitável.

[0066] A molécula de anticorpo pode ser o único ingrediente ativo na composição diagnóstica ou terapêutica ou pode estar acompanhada por outros ingredientes ativos incluindo outros ingredientes de anticorpo, por exemplo anticorpos anti-célula

T, anti-IFN γ ou anti-LPS, ou ingredientes de não-anticorpo tal como xantinas.

[0067] As composições farmacêuticas preferivelmente compreendem uma ate de anticorpo da invenção. O termo "quantidade terapeuticamente efetiva" como aqui usado refere-se a uma quantidade de um agente terapêutico necessário para tratar, melhorar ou prevenir uma condição ou doença alvo, ou para exibir um efeito preventivo ou terapêutico detectável. Para qualquer anticorpo, a dose terapeuticamente efetiva pode ser estimada inicialmente quer em ensaios de cultura celular quer em modelos em animal, normalmente em roedores, coelhos, cães, porcos ou primatas. O modelo em animal também pode ser utilizado para se determinar a faixa de concentração ótima e a rota de administração. Tal informação pode ser então usada para se determinarem doses e rotas úteis para a administração a humanos.

[0068] A quantidade efetiva precisa para um indivíduo humano dependerá da severidade do estado da doença, da saúde geral do indivíduo, da idade, do peso e do sexo do indivíduo, da dieta, do tempo e da frequência de administração, da(s) combinação(ões) de droga, das sensibilidades de reação e da tolerância / resposta à terapia. Esta quantidade pode ser determinada por experimentação rotineira e estás dentro do julgamento do clínico. Em geral, uma dose efetiva será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferivelmente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, com maior preferência de cerca de 15 mg/kg.

[0069] Composições podem ser administradas individualmente a um paciente ou podem ser administradas em combinação com outros agentes, drogas ou hormônios.

[0070] A dose na qual a molécula de anticorpo da presente invenção é administrada depende da natureza da condição a ser tratada, do grau do linfoma maligno ou da leucemia e de se a molécula de anticorpo está sendo usada profilaticamente ou para tratar uma condição existente.

[0071] A frequência de dose dependerá da meia-vida da molécula de anticorpo e da duração de seu efeito. Se a molécula de anticorpo tiver uma meia-vida curta (por exemplo de 2 hora a 10 horas) pode ser necessário que sejam dadas uma ou mais

doses por dia. Alternativamente, se a molécula de anticorpo, tiver uma meia-vida longa (por exemplo 2 dias a 15 dias) pode ser necessário que seja dada uma dose uma vez por dia, uma dose por semana ou até mesmo uma dose a cada 1 mês ou 2 meses.

[0072] Uma composição farmacêutica também pode conter um carreador farmaceuticamente aceitável para a administração do anticorpo. O próprio carreador não deve induzir a produção de anticorpos danosos para o indivíduo recebendo a composição e não deve ser tóxico. Carreadores apropriados podem ser macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tais como proteínas, polipeptídeos, lipossomas, polissacarídeos, polímeros de ácido láctico, polímeros de ácido glicólico, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e partículas virais inativas.

[0073] Sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser usados, por exemplo sais de ácido mineral, tais como cloridretos, bromidretos, fosfatos e sulfatos, ou sais de ácidos orgânicos, tais como acetatos, propionatos, malonatos e benzoatos.

[0074] Os carreadores farmaceuticamente aceitáveis nas composições terapêuticas podem conter adicionalmente líquidos tais como água, solução salina, glicerol e etanol. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsificadores ou substâncias tamponantes de pH, podem estar presentes em tais composições. Tais carreadores permitem que as composições farmacêuticas sejam formuladas como tabletes, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, geles, xaropes, elixires e suspensões, para ingestão por um paciente.

[0075] Formas preferidas para administração incluem formas adequadas para administração parenteral, por exemplo por injeção ou infusão, por exemplo por infusão contínua ou injeção de bolo. Se o produto for para injeção ou infusão, ele poderá tomar a forma de uma suspensão, solução ou emulsão em um carreador aquoso ou oleoso e poderá conter agentes de formulação, tais como agentes de suspensão, conservantes, estabilizadores e/ou dispersantes. Alternativamente, a molécula de anticorpo pode estar na forma seca, para reconstituição antes do uso com um líquido estéril apropriado.

[0076] Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser administradas diretamente ao indivíduo. Os indivíduos a serem tratados podem ser animais. Contudo, é preferido que as composições sejam adaptadas para a administração a indivíduos humanos.

[0077] As composições farmacêuticas desta invenção podem ser administradas por qualquer uma de numerosas rotas incluindo, mas não se limitando a, rotas oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdermal, transcutânea (por exemplo, veja WO98/20734), subcutânea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal ou retal. Hipopulverizações também podem ser usadas para a administração das composições farmacêuticas da invenção. Tipicamente, as composições farmacêuticas podem ser preparadas como injetáveis quer como suspensões quer como soluções líquidas. Formas sólidas adequadas para solução em, ou para suspensão em, carreadores líquidos antes da injeção também podem ser preparadas.

[0078] Liberação direta da composição em geral será realizada por injeção, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa ou intramuscular, ou liberada ao espaço intersticial de um tecido. As composições também podem ser administradas para dentro de uma lesão. Tratamento de dosagem pode ser um planejamento de dose única ou um planejamento de dose múltipla.

[0079] Será reconhecido que o ingrediente ativo na composição será uma molécula de anticorpo. Como tal, ela será suscetível à degradação no trato gastrointestinal. Assim, se a composição for para ser administrada por uma rota usando o trato gastrointestinal, será preciso que a composição contenha agentes que protegem o anticorpo da degradação mas que liberem o anticorpo uma vez tendo sido ele absorvido do trato gastrointestinal.

[0080] Uma discussão completa de carreadores farmacêuticamente aceitáveis está disponível em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J., 1991).

[0081] Também é previsto que o anticorpo da presente invenção seja

administrado pelo uso de uma terapia genética. Com o propósito de se obter isto, as sequências de DNA codificadoras de cadeias leve e pesada da molécula de anticorpo sob o controle de componentes de DNA apropriados são introduzidas em um paciente de tal modo que as cadeias de anticorpo sejam expressadas das sequências de DNA e montadas in situ.

[0082] A presente invenção também proporciona a molécula de anticorpo da presente invenção para uso no tratamento de uma doença mediada por células expressando CD22.

[0083] A molécula de anticorpo da presente invenção pode ser utilizada em qualquer terapia onde ela for desejada para reduzir o nível de células expressando CD22 que estão presentes no corpo animal ou humano. Estas células que expressam CD22 podem estar circulando no corpo ou estar presentes em um nível indesejavelmente elevado em um sítio específico no corpo. Por exemplo, níveis altos de célula expressando CD22 estarão presentes em linfomas de célula B e leucemias. A molécula de anticorpo da presente invenção pode ser utilizada na terapia de doenças mediadas por células expressando CD22.

[0084] A molécula de anticorpo da presente invenção é preferivelmente usada para o tratamento de linfomas malignos e leucemias, mais preferivelmente de NHL.

[0085] A presente invenção também proporciona um método para o tratamento de indivíduos humanos ou animais sofrendo de ou sob risco de um distúrbio mediado por células expressando CD22, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade efetiva de molécula de anticorpo da presente invenção.

[0086] A molécula de anticorpo da presente invenção também pode ser utilizada em diagnose, por exemplo no diagnóstico in vivo e na formação de imagem de estados de doença envolvendo as células que expressam CD22.

[0087] A presente invenção é adicionalmente descrita por meio de ilustração apenas nos seguintes exemplos, que se referem às Figuras acompanhantes, nas quais:

[0088] A Figura 1 mostra a sequência de aminoácidos das CDRs de anticorpo monoclonal de camundongo 5/44 (SEQ ID NOS: 1 a 6);

- [0089]** A Figura 2 mostra a sequência completa do domínio variável de cadeia leve de anticorpo monoclonal de camundongo 5/44;
- [0090]** A Figura 3 mostra a sequência completa do domínio variável de cadeia pesada de anticorpo monoclonal de camundongo 5/44;
- [0091]** A Figura 4 mostra a estratégia para a remoção do sítio de glicosilação e a lisina reativa em CDR-H2;
- [0092]** A Figura 5 mostra o projeto de enxerto para a sequência de cadeia leve de 5/44;
- [0093]** A Figura 6 mostra o projeto de enxerto para a sequência de cadeia pesada de 5/44;
- [0094]** A Figura 7 mostra os vetores pMRR14 e pMRR10.1;
- [0095]** A Figura 8 mostra os resultados do ensaio Biacore de mutantes de 5/44 quiméricos;
- [0096]** A Figura 9 mostra os oligonucleotídeos para montagens de genes gL1 e gH1 de 5/44;
- [0097]** A Figura 10 mostra os vetores intermediários pCR2.1(544gH1) e pCR2.1(544gL1);
- [0098]** A Figura 11 mostra os cassetes de oligonucleotídeo usados para se prepararem outros enxertados;
- [0099]** A Figura 12 mostra o ensaio de competição entre anticorpo 5/44 de camundongo fluorescentemente marcado e variantes enxertadas; e
- [00100]** A Figura 13 mostra a sequência de proteína e o DNA total das cadeias leve e pesada enxertadas.
- [00101]** Descrição detalhada da invenção
- [00102]** Exemplo 1: Geração de anticorpos candidatos
- [00103]** Um painel de anticorpos contra CD22 foi selecionado de hibridomas usando os seguintes critérios de seleção: ligação em células Daudi, internalização sobre células Daudi, ligação em células monoclonares de sangue periférico (PMBC), internalização sobre PBMC, afinidade (maior do que 10^{-9} M), taxa de produção e $\gamma 1$ de camundongo. 5/44 foi selecionado como o anticorpo preferido.

[00104] Exemplo 2: Clonagem de gene e expressão de uma molécula de anticorpo 5/44 quimérica

[00105] Preparação de células de hibridoma 5/44 e preparação de RNA das mesmas

[00106] Hibridoma 5/44 foi gerado por tecnologia de hibridoma convencional após imunização de camundongos com proteína CD22 humana. RNA foi preparado a partir de células de hibridoma 5/44 usando um RNEasy kit (Qiagen, RU; número de catálogo 74106). O RNA obtido foi reversamente transcrito para cDNA, como descrito abaixo.

[00107] Distribuição de CD22 sobre tumores de NHL

[00108] Um estudo de imuno-histoquímica foi realizado para se examinarem a incidência e a distribuição de coloração usando os anticorpos monoclonais 5/44 anti-CD22. Anticorpos de controle anti-CD20 e anti-CD79a foram incluídos no estudo para a confirmação das áreas de célula B dos tumores.

[00109] Um total de 50 tumores foi estudado e estes foram categorizados como segue pelo emprego de sistemas de classificação REAL e Working Formulation:

- 7 linfomas / leucemias linfoblásticas B (Alto/I)
- 4 linfomas linfocíticos pequenos / B-CLL (Baixo/A)
- 3 Imunocistomas / linfoplasmacitoides (Baixo/A)
- 1 célula de manto (Int/F)
- 14 linfomas de folículo central (Baixo a Int/D)
- 13 linfomas de célula grande difusa (Int a Alto/G,H)
- 6 não-classificáveis (K)
- 2 linfomas de célula T

[00110] 40 Linfomas de célula B foram positivos para antígeno CD22 com o anticorpo 5/44 a 0,1 µg/mL e uns outros 6 se tornaram positivos quando a concentração foi aumentada para 0,5 µg/mL. Para os restantes 2 tumores de célula B que foram negativos a 0,1 µg/mL, houve tecido insuficiente restante para o teste em concentração maior. Contudo, teste paralelo com outro anticorpo 6/13 ant-CD22 Celltech, que deu coloração mais forte do que 5/44, resultou em todos os 44

linfomas de célula B corando positivo para CD22.

[00111] Assim, é possível concluir que o antígeno CD22 é amplamente expressado sobre linfomas de célula B e, portanto, proporciona um alvo adequado para imunoterapia em NHL.

[00112] Clonagem por PCR de V_L e V_H de 5/44

[00113] Sequências de cDNA codificadoras de domínios variáveis de cadeias leve e pesada de 5/44 foram sintetizadas usando transcriptase reversa para a produção de cópias de cDNA de fita única a partir do mRNA presente no RNA total. Este foi então usado como o modelo para amplificação das sequências de região V murina usando iniciadores oligonucleotídeos específicos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

a) Síntese de cDNA

[00114] cDNA foi sintetizado em um volume de reação de 20 μ L contendo os seguintes reagentes: Tris-HCl a 50 mM, pH 8,3, KCl a 75 mM, ditiotretitol a 10 mM, $MgCl_2$ a 3 mM, desóxi-ribonucleosídeo-trifosfato cada um a 0,5 mM, 20 unidades de RNasin, 75 ng de iniciador hexanucleotídeo randômico, 2 μ g de RNA de 5/44 e 200 unidades de transcriptase reversa de Vírus da Leucemia Murina de Moloney. Após incubação a 42°C por 60 minutos, a reação foi terminada por aquecimento a 95°C por 5 minutos.

[00115] b) PCR

[00116] Alíquotas do cDNA foram submetidas à PCR usando combinações de iniciadores específicos para as cadeias leve e pesada. Ferramentas de iniciador degenerado projetadas para se anelarem com as sequências conservadas do peptídeo de sinal foram utilizadas como iniciadores diretos. Todas estas sequências contêm, na ordem, um sítio de restrição (V_L SfuI; V_H HindIII) partindo de 7 nucleotídeos de suas extremidades 5', a sequência GCCGCCACC (SEQ ID NO: 50), para permitir a tradução ótima dos mRNAs resultantes, um códon de iniciação e 20-30 nucleotídeos baseados nas sequências de peptídeo líder de anticorpos de camundongo conhecidos (Kabat et al., 1987, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human

Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

[00117] Os iniciadores 3' são projetados para alargarem a junção 4 J-C de região de molde do anticorpo e conterem um sítio de restrição para a enzima BsiW1 para facilitar a clonagem do fragmento V_I PCR. Os iniciadores 3' de cadeia pesada são uma mistura planejada para alargar a junção J-C do anticorpo. O iniciador 3' inclui um sítio de restrição Apal para facilitar a clonagem. A região 3' dos iniciadores contém uma sequência mista baseada naquelas encontradas em anticorpos de camundongo conhecidos (Kabat et al., 1991, supra).

[00118] As combinações de iniciadores descritas acima permitem que os produtos de PCR para V_H e V_I sejam clonados diretamente em um sistema de expressão apropriado (veja abaixo) para se produzirem cadeias leve e pesada quiméricas (camundongo-humano) e para estes genes serem expressados em células de mamífero para a produção de anticorpos quiméricos de isotipo desejado.

[00119] Incubações (100 µL) para a PCR foram configuradas como segue. Cada reação continha Tris-HCl a 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ a 1,5 mM, KCl a 50 mM, gelatina a 0,01% p/v, desoxirribonucleosídeo-trifosfato cada um a 0,25 mM, 10 pmoles de mistura de iniciador 5', 10 pmoles de iniciador 3', 1 µL de cDNA e 1 unidade de Taq polimerase. Reações foram incubadas a 95°C por 5 minutos e depois submetidas ao ciclo a 94°C por 1 minuto, a 55°C por 1 minuto e a 72°C por 1 minuto. Após 30 ciclos, alíquotas de cada reação foram analisadas por eletroforese sobre um gel de agarose.

[00120] Para a região V de cadeia pesada, um produto de DNA amplificado foi obtido apenas quando um de conjunto de iniciadores anelando dentro do início de região de molde I substituiu o conjunto de iniciadores de peptídeo de sinal. Os fragmentos foram clonados em vetores de sequenciamento de DNA. A sequência de DNA foi determinada e traduzida para dar uma sequência de aminoácidos deduzida. Esta sequência deduzida foi verificada pela referência à sequência de proteína N-terminal determinada de modo experimental. Figuras 2 e 3 mostram a sequência de proteína/DNA das regiões V de cadeia pesada e leve maduras de 5/44 monoclonal de camundongo respectivamente.

[00121] c) Clonagem molecular dos fragmentos da PCR

[00122] As sequências de região v de murina foram então clonadas nos vetores de expressão pMRR10.1 e pMRR14 (Figura 1). Estes são vetores para a expressão de cadeia leve e pesada respectivamente contendo DNA codificador de regiões constantes de cadeia leve kappa humana e de cadeia pesada gama-4 humana. A região V_L foi sub-clonada no vetor de expressão por digestão de restrição e ligação do vetor de seqüenciamento, usando os sítios de restrição SfuI e BsiWI, formando o plasmídeo pMRR10(544cL). O DNA de cadeia pesada foi amplificado por PCR usando um iniciador 5' para introduzir um peptídeo de sinal, visto que este não foi obtido na estratégia de clonagem - um líder de anticorpo de cadeia pesada de camundongo de um hibridoma local diferente (chamado de 162) foi empregado. O iniciador 5' teve a seguinte sequência:

[00123] 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCCTGGCACTCATTCTCAAGGGAGTGACAGTGTGAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGG^{3'} (SEQ ID NO: 51).

[00124] O iniciador reverso foi idêntico àquele usado na clonagem de gene V_H original. O produto da PCR resultante foi digerido com as enzimas HindIII e ApaI, foi sub-clonado, e sua sequência de DNA foi confirmada, formando o plasmídeo pMRR14(544cH). Co-transfecção transiente de ambos os vetores de expressão em células CHO gerou anticorpo c5/44 quimérico. Isto foi conseguido usando o reagente Lipofectamine de acordo com os protocolos do fabricante (inVitrogen:Life Technologie, Groningen, Países-Baixos, número de catálogo 11688-027).

[00125] Remoção do sítio de glicosilação e da lisina reativa

[00126] Uma sequência de sítio de glicosilação N-ligada potencial foi observada em CDR-H2, possuindo a sequência de aminoácidos N-Y-T (Figura 3). SDS-PAGE, Western blotting e coloração de geles com carboidrato de 5/44 e de seus fragmentos (incluindo Fab) indicaram que este sítio estava de fato glicosilado (não mostrado). Em adição, um resíduo de lisina foi observado em uma posição exposta dentro de CDR-H2, que tinha o potencial de reduzir a afinidade de ligação pelo anticorpo pela provisão de um sinal adicional para a conjugação com um agente com o qual o

anticorpo pode ser conjugado.

[00127] Uma estratégia de PCR foi empregada para introduzir substituições de aminoácido na sequência de CDR-H2 em uma tentativa para remover o sítio de glicosilação e/ou a lisina reativa, como mostrado na Figura 4. Iniciadores diretos codificadores de mutações N55Q, T57A ou T57V foram usados para remover o sítio de glicosilação (Figura 4) e um quarto iniciador direto contendo a substituição K60R, foi gerado para remover o resíduo de lisina reativa (Figura 4). Um iniciador reverso de região de molde 4 foi usado em cada uma destas amplificações por PCR. Os produtos da PCR foram digeridos com as enzimas XbaI e ApaI e foram inseridos em pMRR14(544cH) (também clivado com XbaI e ApaI) para gerar os plasmídeos de expressão codificadores destes mutantes. As mutações N55Q, T57A e T57V removem o sítio de glicosilação pela mudança da sequência de aminoácidos para longe do consenso N-X-T/S enquanto que a mutação K60R substitui a lisina potencialmente reativa pelo resíduo semelhantemente positivamente carregado arginina. Os plasmídeos variantes cH resultantes foram co-transfectados com o plasmídeo cL para gerarem as variantes de anticorpo quimérico expressado.

[00128] Avaliação das atividades de genes quiméricos

[00129] As atividades dos genes quiméricos foram avaliadas após a transfecção transiente em células CHO.

[00130] c) Determinação das constantes de afinidade por análise BioCore

[00131] As afinidades de 5/44 quimérico ou de suas variantes, que haviam tido seu sítio de glicosilação ou sua lisina reativa removidos, foram investigadas usando a tecnologia BIA para ligação em constructos CD22-mFc. Os resultados são mostrados na Figura 8. Todas as medições de ligação foram realizadas no instrumento Biacore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB, Upsala, Suécia). O ensaio foi conduzido pela captura de CD22mFc via Fc anti-camundongo imobilizado. O anticorpo estava na fase solúvel. Amostras, padrão, e controles (50 µL) foram injetados sobre Fc anti-camundongo imobilizado seguidas pelo anticorpo na fase solúvel. Após cada ciclo a superfície foi regenerada com 50 µL de HCl a 40 mM a 30 µL/min. A análise cinética foi realizada usando o programa de computador

BIAevaluation 1.3 (Pharmacia).

[00132] Remoção do sítio de glicosilação no constructo T57A resultou em uma associação (on-rate) ligeiramente mais rápida e em uma dissociação (off-rate) significativamente mais lenta comparada com 5/44 quimérico, dando uma melhoria de afinidade de aproximadamente 5 vezes. A mutação N55Q não teve efeito sobre a afinidade. Este resultado foi surpreendente visto que ele sugere que a remoção do próprio carboidrato aparentemente não tem qualquer efeito sobre a ligação (como com a mudança N55Q). A afinidade melhorada foi observada apenas com a mudança T57A. Uma explicação possível é que, independente da presença de carboidrato, a treonina na posição 57 exerce um efeito negativo sobre a ligação que é removida sob conversão da treonina para alanina. A hipótese de que o tamanho pequeno da alanina é importante, e de que o efeito negativo da treonina está relacionado com o seu tamanho, é confirmada pelo resultado obtido usando a mutação T57V: que a substituição por valina na posição 57 não é benéfica (resultados não mostrados).

[00133] Remoção de lisina pela mutação K60R teve um efeito neutro sobre a afinidade, isto é a introdução de arginina remove o sítio reativo potencial sem comprometer a afinidade.

[00134] As mutações para a remoção do sítio de glicosilação e para a remoção da lisina reativa foram portanto ambas incluídas no projeto de humanização.

[00135] Exemplo 2: Enxerto de CDR de 5/44

[00136] A clonagem molecular de genes para as regiões variáveis das cadeias pesada e leve do anticorpo 5/44 e seu uso para a produção de anticorpos 5/44 quiméricos (camundongo/humano) tem sido descrita acima. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos domínios V_H e V_B de 5/44 de camundongo são mostradas nas Figuras 2 e 3 (SEQ ID NOS: 7 e 8), respectivamente. Este exemplo descreve a enxerto de CDR de anticorpo 5/44 sobre regiões estruturais humanas para reduzir a imunogenicidade potencial em humanos, de acordo com o método de Adair et al., (WO91/09967).

[00137] Enxerto de CDR de cadeia leve de 5/44

[00138] O alinhamento de sequência de proteína com as sequências de consenso de região V de cadeia leve kappa de sub-grupo I humana indicou identidade de sequência de 64%. Conseqüentemente, para a construção da cadeia leve enxertada com CDR, as regiões estruturais aceptoras escolhidas corresponderam àquelas de sequência O12,DPK9 de linhagem germinativa de sub-grupo i de VK humana. A sequência aceptora de região de molde 4 foi derivada da sequência de linhagem germinativa de região J humana JK1.

[00139] Uma comparação das sequências de aminoácidos das regiões estruturais de 5/44 murino e da sequência aceptora é dada na Figura 5 e mostra que há 27 diferenças entre as cadeias aceptora e doadora. Em cada posição, uma análise foi feita do potencial do resíduo murino de contribuir para a ligação em antígeno, quer direta quer indiretamente, por meio de efeitos sobre o empacotamento ou na interface de V_H/V_L . Se um resíduo murino foi considerado importante e suficientemente diferente do resíduo humano em termos de tamanho, polaridade ou carga, então aquele resíduo de murino foi retido. Baseando-se nesta análise, duas versões da cadeia leve enxertada com CDR, possuindo as sequências em SEQ ID NO: 19 e em SEQ ID NO: 20 (Figura 5), foram construídas.

[00140] Enxerto de CDR de cadeia pesada de 5/44

[00141] Enxerto de CDR de cadeia pesada de 5/44 foi realizada usando a mesma estratégia que a descrita para a cadeia leve. Foi verificado que o domínio V da cadeia pesada de 5/44 é homólogo às cadeias pesadas humanas pertencentes ao sub-grupo I (identidade de sequência de 70%) e portanto a sequência de região de molde de linhagem germinativa de sub-grupo I humana VH1-3,DP7 foi usada como uma região de molde aceptora. As sequências aceptoras de região de molde 4 foram derivadas da sequência de linhagem germinativa de região J humana JH4.

[00142] Uma comparação da cadeia pesada de 5/44 com as regiões estruturais é mostrada na Figura 6 onde pode ser visto que a cadeia pesada de 5/44 difere da sequência aceptora nas posições 22. Análise da contribuição que qualquer uma dessas pode ter para a ligação em antígeno acarretou na construção de 5 versões de cadeias pesadas enxertada com CDRs, possuindo as sequências dadas em SEQ

ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 27 (Figura 6).

[00143] Construção de genes para as sequências enxertadas

[00144] Genes foram projetados para codificarem as sequências enxertadas gH1 e gL1, e uma série de oligonucleotídeos de recobrimento foi projetada e construída (Figura 9). Uma técnica de montagem de PCR foi empregada para a construção de genes de região V enxertada com CDR. Volumes de reação de 100 µL foram configurados contendo Tris-HCl a 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ a 1,5 mM, KCl a 50 mM, 0,001% de gelatina, desoxirribonucleosídeo-fosfato cada um a 0,25 mM, 1 pmol de cada um dos iniciadores 'internos' (T1, T2, T3, B1, B2, B3), 10 pmoles de cada um dos iniciadores 'externos' (F1, R1), e 1 unidade de Taq polimerase (AmpliTaq, Applied BioSystems, número de catálogo N808-0171). Parâmetros de ciclo de PCR foram 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, para 30 ciclos. Os produtos de reação foram então corridos sobre um gel de agarose a 1,5%, excisados e recuperados usando colunas QIAGEN spin (QIAquick gel extraction kit, número de catálogo 28706). O DNA foi eluído em um volume de 30 µL. Alíquotas (1 µL) de gH1 e gL1 DNA foram então clonadas no vetor pCR2.1 TOPO de clonagem InVitrogen TOPO TA (número de catálogo K4500-01) de acordo com as instruções do fabricante. Este vetor de não expressão serviu como um intermediário de clonagem para facilitar o seqüenciamento de um grande número de clones. Seqüenciamento de DNA usando iniciadores vetor-específicos foi usado para identificar os clones corretos contendo gH1 e gL1, formando plasmídeos pCR2.1 (544gH1) e pCR2.1(544gL1) (Figura 10).

[00145] Um método de substituição de cassete de oligonucleotídeo foi utilizado para formar os enxertados humanizados gH4,5,6 e 7, e gL2. Figura 11 mostra o desenho dos cassetes de oligonucleotídeo. Para se construir cada variante, o vetor (pCR2.1(544gH1) ou pCR2.1(544gL1)) foi cortado com as enzimas de restrição mostradas (XmaI/SacII para a cadeia pesada, XmaI/BstEII para a cadeia leve). O fragmento de vetor grande foi purificado em gel a partir de agarose e foi usado na ligação com o cassete de oligonucleotídeo. Estes cassetes são compostos de 2

oligonucleotídeos complementares (mostrados na Figura 11), misturados em uma concentração de 0,5 pmol/ μ L em um volume de 200 μ L de Tris-HCl a 12,5 mM, pH 7,5, MgCl₂ a 2,5 mM, NaCl a 25 mM, ditioeritritol a 0,25 mM. Anelamento foi conseguido pelo aquecimento a 95°C por 3 minutos em um banho de água (volume de 500 mL) depois permitindo que a reação esfriasse lentamente para a temperatura ambiente. O cassete de oligonucleotídeo anelado foi então diluído dez vezes em água antes da ligação no vetor apropriadamente cortado. O seqüenciamento de DNA foi usado para confirmar a sequência correta, formando os plasmídeos pCR2.1 (5/44-gH4-7) e pCR2.1 (5/44-gL2). As sequências enxertadas verificadas foram então sub-clonadas nos vetores de expressão pMRR14 (cadeia pesada) e pMR10.1 (cadeia leve).

[00146] Atividade de ligação em CD22 das sequências enxertada com CDRs

[00147] Os vetores codificadores de variantes enxertadas foram co-transfectados em células CHO em uma variedade de combinações, juntos com as cadeias de anticorpo quimérico original. A atividade de ligação foi comparada em um ensaio de competição, competindo a ligação do anticorpo de camundongo original 5/44 para a ligação em células Ramos (obtidas de ATCC, uma linhagem celular humana de linfoblasto de linfoma de Burkitt expressando CD22 de superfície). Este ensaio foi considerado o melhor modo de se compararem os enxertados em sua capacidade de se ligarem em CD22 de superfície celular. Os resultados são mostrados na Figura 8. Como pode ser visto, há muito pouca diferença entre qualquer um dos enxertados, todos desempenhando mais efetivamente do que o quimérico em competição contra o parental murino. A introdução de 3 resíduos humanos adicionais na extremidade de CDR-H3 (gH5 e gH7) não parece ter afetado a ligação.

[00148] A combinação de enxerto com o menor número de resíduos murinos foi selecionada, gL1gH7. O enxerto de cadeia leve gL1 possui 6 resíduos doadores. Resíduos V2, V4, L37 e Q45 são resíduos de empacotamento potencialmente importantes. Resíduo H38 está na interface V_H/V_L. Resíduo D60 é um resíduo de superfície próximo de CDR-L2 e pode contribuir diretamente para a ligação em antígeno. Destes resíduos, V2, L37, Q45 e D60 são verificados em sequências de

linhagem germinativa de genes kappa humanos de outros sub-grupos. O enxertado de cadeia pesada gH7 possui 4 resíduos de região de molde doadoras (Resíduo R28 é considerado parte de CDR-H11 sob a definição estrutural usada na Enxerto de CDR (veja Adair et al. (1991 WO91/09967)). Resíduos E1 e A71 são resíduos de superfície próximos de CDR's. Resíduo 148 é um resíduo de empacotamento potencial. Resíduo T93 está presente na interface V_H/V_L . Destes resíduos, E1 e A71 são encontrados em outros genes de linhagem germinativa de sub-grupo I humano. Resíduo I48 é encontrado no sub-grupo 4 de linhagem germinativa humana, e T73 é encontrado em sub-grupo 3 de linhagem germinativa humana.

[00149] As sequências de proteína e de DNA total de ambas a cadeia leve e a cadeia pesada, incluindo a posição aproximada de íntrons dentro dos genes de região constante proporcionados pelos vetores, são mostradas na Figura 13 e são dadas na SEQ ID NO: 29 e na SEQ ID NO: 28 respectivamente para a cadeia leve e na SEQ ID NO: 31 e na SEQ ID NO: 30 respectivamente para a cadeia pesada.

[00150] DNA codificador destes genes de cadeias pesada e leve foi excisado destes vetores. DNA de cadeia pesada foi digerido no sítio 5' HindIII, então foi tratado com o fragmento Klenow de DNA polimerase I de E. coli para formar uma extremidade 5' cega. Clivagem no sítio 3' EcoRI resultou no fragmento de cadeia pesada que foi purificado em geles de agarose. Na mesma maneira, um fragmento de cadeia leve foi produzido, cegado no sítio 5' SfuI e com um sítio 3' EcoRI. Ambos os fragmentos foram clonados em vetores de expressão baseados em DHFR e usados para a geração de linhagens celulares estáveis em células CHO.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de anticorpo possuindo especificidade para CD22 humana, caracterizada pelo fato de compreender uma cadeia pesada em que o domínio variável compreende SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 13 ou SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 16 ou a sequência GINPGNNYATYRRKFQG de gH7 na figura 6 para CDR-H2 e SEQ ID NO: 3 para CDR-H3, e uma cadeia leve em que o domínio variável compreende SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 e SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

2. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de compreender preferencialmente a sequência GINPGNNYATYRRKFQG de gH7 na figura 6 para CDR-H2.

3. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de ser uma molécula de anticorpo enxertada com CDR.

4. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o domínio variável compreende regiões estruturais aceptoras humanas e CDRs doadoras não humanas.

5. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que as regiões estruturais aceptoras humanas do domínio variável da cadeia pesada baseiam-se nas SEQ ID NOs: 21 e 22 e compreendem resíduos doadores nas posições 1, 28, 48, 71 e 93, como numeradas de acordo com Kabat, que correspondem aos resíduos 1, 28, 48, 72 e 97, respectivamente, na SEQ ID NO: 8.

6. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender resíduos doadores nas posições 67 e 69, como numeradas de acordo com Kabat, que correspondem aos resíduos 68 e 70, respectivamente, na SEQ ID NO: 8.

7. Molécula de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizada pelo fato de que as regiões estruturais aceptoras humanas do domínio variável da cadeia leve baseiam-se SEQ ID NOs: 17 e 18 e compreendem resíduos doadores nas posições 2, 4, 37, 38, 45 e 60 que correspondem aos

resíduos 2, 4, 42, 43, 50 e 65, respectivamente, na SEQ ID NO: 7.

8. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um resíduo doador na posição 3, como numeradas de acordo com Kabat, que corresponde ao resíduo naquela posição na SEQ ID NO: 7.

9. Molécula de anticorpo possuindo especificidade para CD22 humana, caracterizada pelo fato de compreender uma cadeia pesada como definida na reivindicação 5, e uma cadeia leve como definida na reivindicação 7.

10. Molécula de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, 7 ou 9, caracterizada pelo fato de compreender a região variável de cadeia leve 5/44-gL1 (SEQ ID NO: 19) e a região variável de cadeia pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO: 27).

11. Molécula de anticorpo possuindo especificidade para CD22 humana, caracterizada pelo fato de possuir uma cadeia leve compreendendo a sequência dada na SEQ ID NO: 28 e uma cadeia pesada compreendendo a sequência dada na SEQ ID NO: 30.

12. Molécula de anticorpo possuindo especificidade para CD22 humana, caracterizada pelo fato de possuir uma cadeia leve consistindo da sequência dada na SEQ ID NO: 28 e uma cadeia pesada consistindo da sequência dada na SEQ ID NO: 30.

13. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser anticorpo monoclonal murino 5/44 anti-CD22, no qual o domínio variável da cadeia leve possui a sequência dada na SEQ ID NO: 7, e o domínio da cadeia pesada possui a sequência dada na SEQ ID NO: 8.

14. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser uma molécula de anticorpo quimérica compreendendo as sequências de domínios variáveis de cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 13, citadas na SEQ ID NO: 7 e na SEQ ID NO: 8, respectivamente.

15. Molécula de DNA, caracterizada pelo fato de ser codificadora da

cadeia pesada de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

16. Molécula de DNA, caracterizada pelo fato de ser codificadora da cadeia leve de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

17. Molécula de DNA, caracterizada pelo fato de ser codificadora da cadeia pesada e da cadeia leve de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

18. Vetor de expressão ou clonagem, caracterizado pelo fato de compreender uma molécula de DNA como definida em qualquer uma das reivindicações 15 a 17.

19. Uso da molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, possuindo especificidade para CD22 humano, ou uso de uma molécula de DNA como definida em qualquer uma das reivindicações 15 a 17, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para o tratamento de uma patologia mediada por células expressando CD22.

20. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a patologia é linfoma maligno.

21. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o linfoma é linfoma de Não-Hodgkin.

22. Composição diagnóstica ou terapêutica, caracterizada pelo fato de compreender a molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 ou a molécula de DNA como definida em qualquer uma das reivindicações 15 a 17.

23. Composição terapêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que a molécula de anticorpo tem uma toxina ligada a mesma por uma estrutura de ponte covalente, e compreender um carreador, diluente ou excipiente farmacologicamente aceitável.

24. Composição diagnóstica ou terapêutica de acordo com a reivindicação

22, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender anticorpos anti-célula T, anti-INF γ ou anti-LPS, ou ingredientes de não-anticorpo tais como xantinas.

25. Processo para a produção de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de compreender a cultura de uma célula hospedeira que compreende um vetor de expressão ou clonagem como definido na reivindicação 18 sob condições adequadas para acarretar a expressão de proteína a partir de DNA codificador de citada molécula de anticorpo e o isolamento da citada molécula de anticorpo.

26. Processo para a preparação de uma composição diagnóstica ou terapêutica como definida nas reivindicações 22 ou 24, caracterizado pelo fato de compreender a misturação de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 juntamente com um carreador, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

FIG.1**Seqüência de CDRs de 5/44 monoclonal de camundongo**

H1	NYWIIH	(SEQ ID NO:1)
H2	GINPGNNYTTYKRNLKG	(SEQ ID NO:2)
H3	EGYGNYGAWFAY	(SEQ ID NO:3)
L1	RSSQSLANSYGNTFLS	(SEQ ID NO:4)
L2	GISNRFS	(SEQ ID NO:5)
L3	LQGTHQPYT	(SEQ ID NO:6)

FIG.2

Sequência de DNA/Proteína de 5/44 V_L

10	20	30	40	50	
GAT GTT GTG GTG ACT CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGC TTT GGA GAT CAA GTT					
CTA CAA CAC CAC TGA GTT TGA GGT GAG AGG GAC GGA CAG TCG AAA CCT CTA GTT CAA					
D V V V T Q T P L S L P V S F G D Q V>					
60	70	80	90	100	110
TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT GGG AAC ACC TTT TTG					
AGA TAG AGA ACG TCC AGA TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA CCC TTG TGG AAA AAC					
S I S C R S S Q S L A N S Y G N T F L>					
120	130	140	150	160	170
TCT TGG TAC CTG CAC AAG CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC					
AGA ACC ATG GAC GTG TTC GGA CCG GTC AGA GGT GTC GAG GAG TAG ATA CCC TAA AGG					
S W Y L H K P G Q S P Q L L I Y G I S>					
180	190	200	210	220	
AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC					
TTG TCT AAA AGA CCC CAC GGT CTG TCC AAG TGA CCG TCA CCA AGT CCC TGT CTA AAG					
N R F S G V P D R F T G S G S G T D F>					
230	240	250	260	270	280
ACA CTC AAG ATC AGC ACA ATA AAG CCT GAG GAC TTG GGA ATG TAT TAC TGC TTA CAA					
TGT GAG TTC TAG TCG TGT TAT TTC GGA CTC CTG AAC CCT TAC ATA ATG ACG AAT GTT					
T L K I S T I K P E D L G M Y Y C L Q>					
290	300	310	320	330	
GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGT					
CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGC AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCA					
G T H Q P Y T F G G G T K L E I K R>					

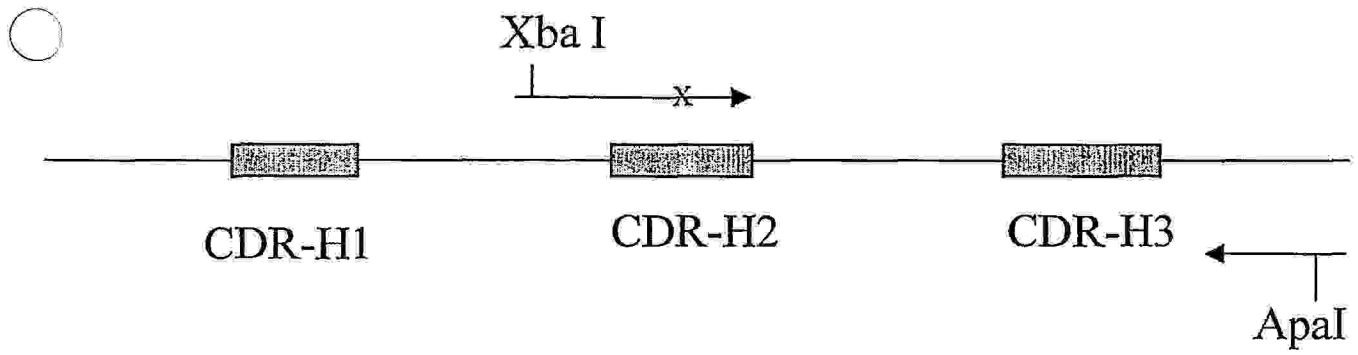
FIG.3
Seqüência de DNA/Proteína de 5/44 V_H

10	20	30	40	50	
GAG GTC CAA CTG CAG CAG TCT GGG ACT GTA CTG GCA AGG CCT GGG GCT TCC GTG AAG					
CTC CAG GTT GAC GTC GTC AGA CCC TGA CAT GAC CGT TCC GGA CCC CGA AGG CAC TTC					
E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K>					
60	70	80	90	100	110
ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC AGG TTT ACC AAC TAC TGG ATT CAC TGG GTA AAA					
TAC AGG ACG TTC CGA AGA CCG ATG TCC AAA TGG TTG ATG ACC TAA GTG ACC CAT TTT					
M S C K A S G Y R F T N Y W I H W V K>					
120	130	140	150	160	170
CAG AGG CCT GGG CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GGT ATT AAT CCT GGA AAT AAT TAT					
GTC TCC GGA CCC GTC CCA GAT CTT ACC TAA CCA CCA TAA TTA GGA CCT TTA TTA ATA					
Q R P G Q G L E W I G G I N P G N N Y>					
180	190	200	210	220	
ACT ACG TAT AAG AGG AAC TTG AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC					
TGA TGC ATA TTC TCC TTG AAC TTC CCG TTC CGG TGT GAC TGA CGT CAG TGT AGG CGG					
T T Y K R N L K G K A T L T A V T S A>					
230	240	250	260	270	280
AGC ACT GCC TAC ATG GAC CTC AGC AGC CTG ACA AGT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC					
TCG TGA CGG ATG TAC CTG GAG TCG TCG GAC TGT TCA CTC CTG AGA CGC CAG ATA ATG					
S T A Y M D L S S L T S E D S A V Y Y>					
290	300	310	320	330	340
TGT ACA AGA GAG GGC TAT GGT AAC TAC GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGG					
ACA TGT TCT CTC CCG ATA CCA TTG ATG CCC CGG ACC AAA CGA ATG ACC CCG GTC CCC					
C T R E G Y G N Y G A W F A Y W G Q G>					
350	360				
ACT CTG GTC ACC GTC TCC TCA					
TGA GAC CAG TGG CAG AGG AGT					
T L V T V S S>					

FIG.4

Remoção de Sítio de Glicosilação e de Lisina Reativa

Estratégia de PCR para mutar CDR-H2 em vetor cH

**CDR-H2**

			55	60	65
			.	.	.
cH			GNNYTTYKRNLKG		
N55Q	H2''		GNQYTTYKRNLKG		
T57A	H2'		GNNYATYKRNLKG		
T57V			GNNYVTYKRNLKG		

FIG.5**Projeto de Enxerto de Sequência de Cadeia Leve de 5/44**

	10	20	40
V _L	DVVVTQTPLSLPVSEFGDQVSISC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGQSPQLLIY
DPK9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC		WYQQKPGKAPKLLIY
gL1	DVQVTQSPSSLSASVGDRVITITC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGKAPQLLIY
gL2	DVVVTQSPSSLSASVGDRVITITC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGKAPQLLIY
	60	70	80
V _L	GISNRFS	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYC	LQGTHQPYT
DPK9		GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	
gL1	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	LQGTHQPYT
gL2	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	LQGTHQPYT
	100		
V _L	FGGGTKLEIKR		
JK1	FGQGTKVEIKR		
gL1	FGQGTKVEIKR		
gL2	FGQGTKVEIKR		

DPK-9 é a sequência estrutural aceptora de linhagem germinativa humana.

Linhas verticais indicam diferenças entre os resíduos de humano e de camundongo.

Sequências sublinhadas indicam resíduos doadores que têm sido retidos no enxerto.

CDRs são indicadas em azul (não mostrado para DPK-9).

Enxerto gL1 possui 6 resíduos de molde doadores, gL2 possui 7.

FIG.6**Projeto de Enxerto de Seqüência de Cadeia Pesada de 5/44**

	10	20	30	40	50
V _H	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYRFT	NYW	IHWVKQRP	GGLEWIG	GINP
DP7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT			WVRQAPGQGLEWMG	
gH1	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYRFT</u>	NYW	IHWVRQAP	GGLEWIG	GINP
gH4,5,6,7	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYRFT</u>	NYW	IHWVRQAP	GGLEWIG	GINP
	60	70	80	90	100
V _H	GNNYTTYKRNLKG	KATLTAVTSASTAYMDLSSLTSEDSAVYYCTR	EGYGNYG		
DP7	KFQG	RVTMT	RDSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCAR	
gH1	GNNYTTYKRNLKG	<u>RATLTADTSTSTVYME</u>	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH4	GNNYATYRRNLKG	<u>RATLTADTSTSTVYME</u>	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH5	GNNYATYRRNLKG	RVTMT	ADTSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG
gH6	GNNYATYRRKFQG	<u>RATLTADTSTSTVYME</u>	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH7	GNNYATYRRKFQG	RVTMT	ADTSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG
	110				
JH4	WGQGLTVTVSS				
V _H	AWFAY	WGQGLTVTVSS			
gH1	AWFAY	WGQGLTVTVSS			
gH4,5,6,7	AWFAY	WGQGLTVTVSS			

DP7 é a seqüência estrutural aceptora de linhagem germinativa humana.

Linhas verticais indicam diferenças entre os resíduos de humano e de camundongo.

Seqüências sublinhadas indicam resíduos doadores que têm sido retido no enxerto.

CDRs são indicadas em azul (não mostrado para DP7).

Enxertos gH4 e gH6 possuem 6 resíduos de molde doadores.
Enxertos gH5 e gH7 possuem 4.

FIG.7
Mapas de pMRR14 e de pMRR10.1

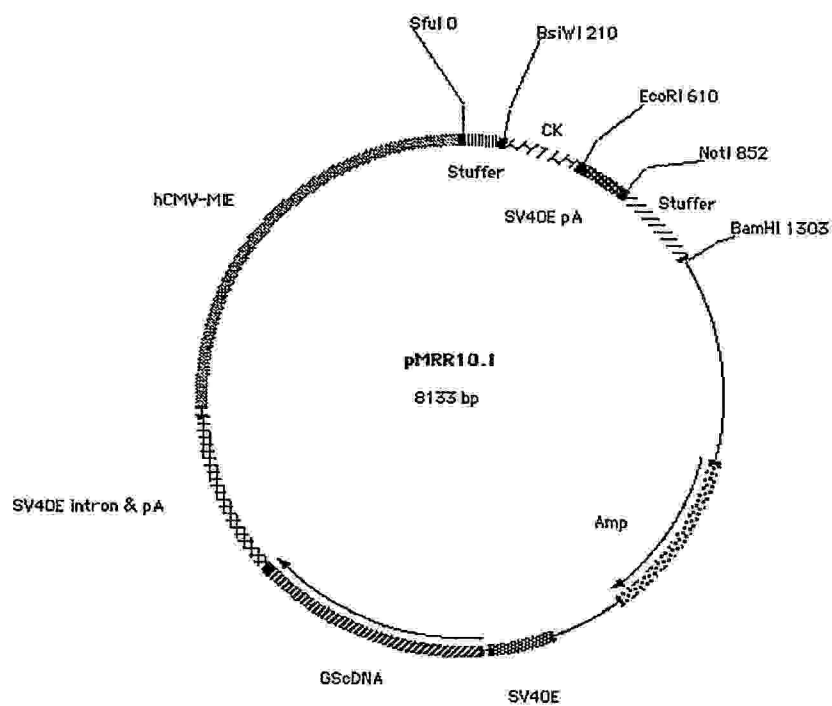
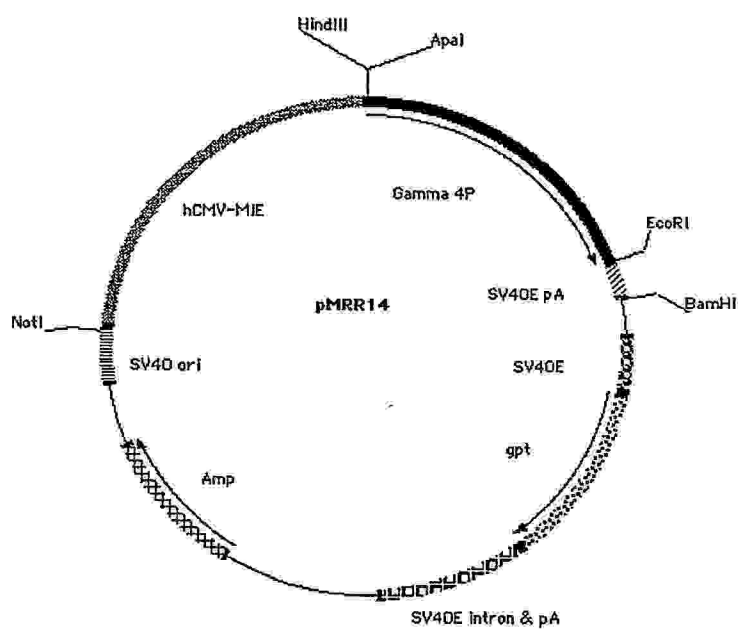


FIG.8**Ensaio Biacore de mutantes e 5/44 quimérico**

5/44	$K_a \text{ e}^5$	$K_d \text{ e}^{-4}$	$KD \text{ e}^{-10}$	$\sim KD \text{ nM}$
cLcH	2.9	1.14	3.93	0.4
N55Q	5.81	1.9	3.27	0.3
T57A	7.8	0.51	0.66	0.07
K60R	4.95	1.01	2.04	0.2

FIG.9

Oligonucleotídeos para montagens de gene gL1 e gH4 de 5/44.

Cadeia pesada

544gH1 T1

AGTGTGAGGTGCAATTGGTCCAGTCAGGAGCAGAGGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCA
AAGTTTCGTGTAAGGCTAGCGGCTACAGGTTAC

544gH1 T2

GTGGCATTAAATCCCGGGAATCAGTACACTACATATAAAAGAAATCTAAAGGGCAGAGCA
ACGCTGACCGCGGACACCTCCACAAGCACTGTCTACA

544gH1 T3

AGAGAAGGCTACGGTAATTACGGAGCCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGTACCCTAGTC
ACAGTCTCCTCAGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

544 gH1 B1

GGACCAATTGCACCTCACACTGCACTCCCTTGAGAATGAGTGCCAGGAACACGAGAGAG
AATCCGAAGTCCATGGTGGCGGCAAGCTTTTATTC

544 gH1 B2

GATTCCCGGGATTAATGCCACCGATCCATTCCAGGCCTTGTTCCCGGAGCCTGCCTGACCC
AATGAATCCAATAATTTGTGAACCTGTAGCCGCTAGC

544gH1 B3

CGTAATTACCGTAGCCTTCTCTAGTACAATAGTACACTGCGGTGTCCTCGGATCTCAGAG
ATGACAGCTCCATGTAGACAGTGCTTGTGGAGG

544gH1 F1

GAATAAAAGCTTGCCGCCACC

544gH1 R1

TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

FIG.9(cont.)**b) Cadeia leve**

544 gL1 T1

GCTTCCCGGGGTGACGTTCAAGTGACCCAGAGCCCATCCAGCCTGAGCGCATCTGTAGGA
GACCGGGTCACCATCACTTGTAGATCC

544 gL1 T2

TATCTGCACAAACCAGGTAAAGCCCCACAATTGCTCATCTACGGAATCTCTAACAGATT
AGTGGTGTACCAGACAGGTTTCAGCGGTTCC

544gL1 T3

AGATTTGCCACTTATTACTGTTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACATTCGGTCAGGG
TACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGCGTGC

544gL1 B1

GAACGTCACCCCGGGAAGCAGGAATCCAGAACAACAGAAGCACCAACAGCCTAACAGG
CAACTTCATGGTGGCGGCTTCGAATCATCC

544gL1 B2

CTTTACCTGGTTTGTGCAGATACCAAGACAAAAAGGTGTTCCATAACTGTTTGCAAGAC
TCTGACTGGATCTACAAGTGATGGTGAC

544gL1 B3

AACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGAGACGAGATCGTGAGGGTGAAATCA
GTACCACTTCCGGAACCGCTGAACCTGTCTG

544gL1 F1

GGATGATTCTGAAGCCGCCAC

544gL1 R1

GCACGCCGTACGTTTGATTTC

FIG.10

Mapas de plasmídeo de vetores intermediários
pCR2.1(544gH1) e pCR2.1(544gL1).

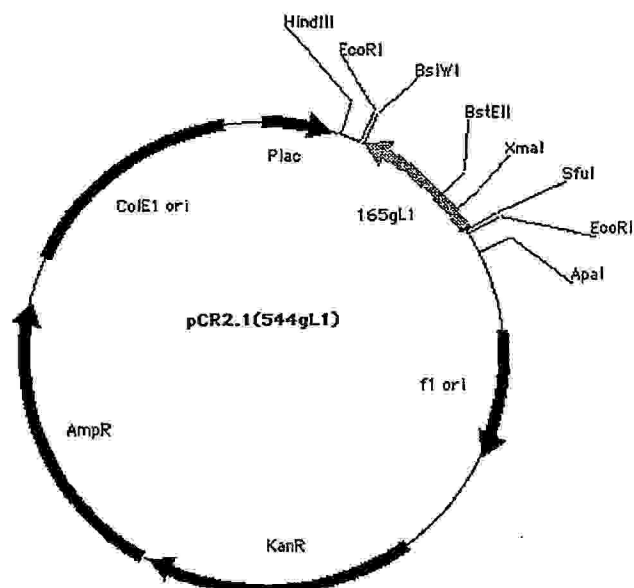
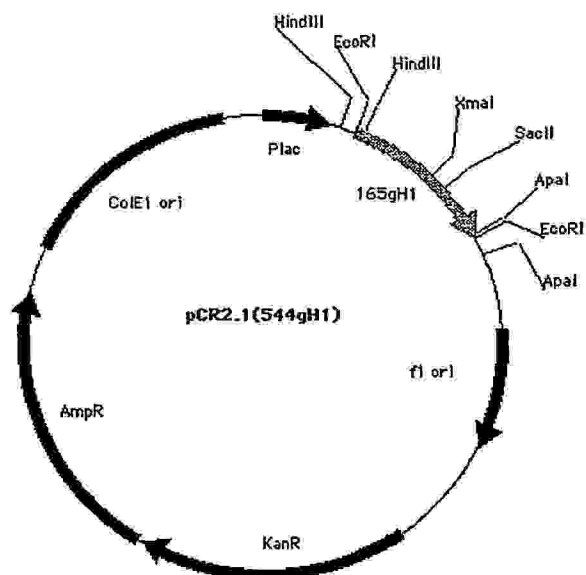


FIG.11

Cassetes de oligonucleotídeo usados para a preparação de outros enxertos.

gH4

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG						
P G N N Y A T Y R R N L K G R A T L T A						

gH5

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A						

gH6

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R A T L T A						

gH7

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A						

gL2

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	60	<u>BstEII</u>
C CGG GGT GAC GTT GTC GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG							
CCA CTG CAA CAG CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC CAG TG							
S R G D V V V T Q S P S S L S A S V G D R V T							

FIG.12

Ensaio de competição, competição de ligação de anticorpo 5/44 de camundongo fluorescentemente marcado com as variantes enxertadas.

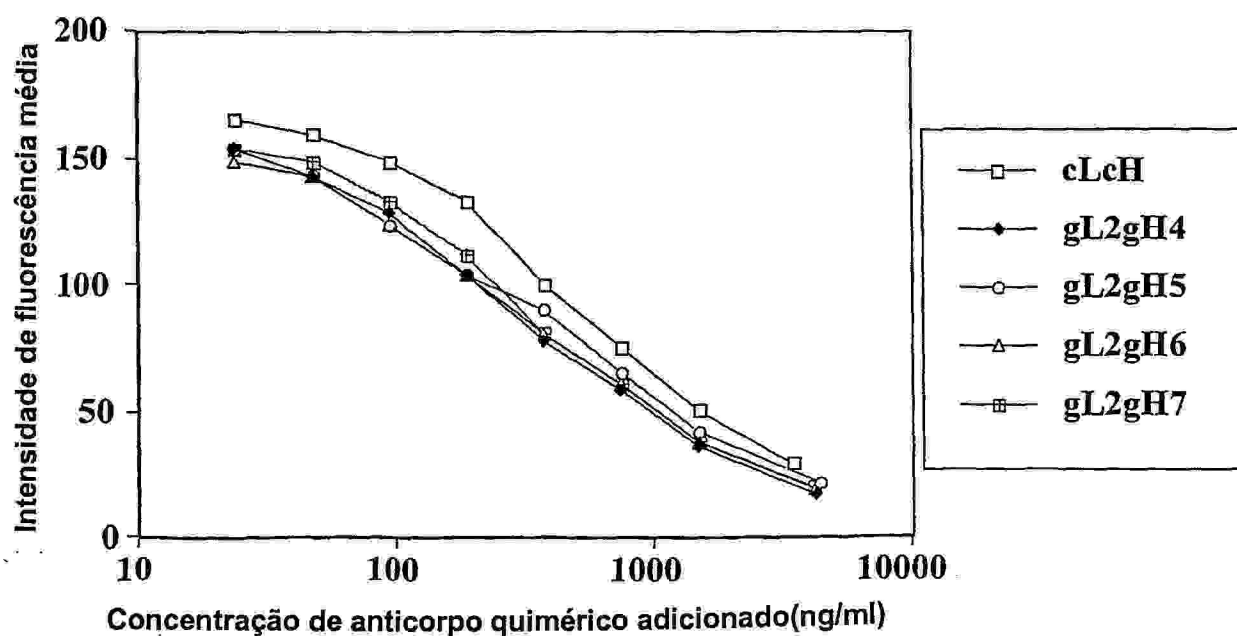
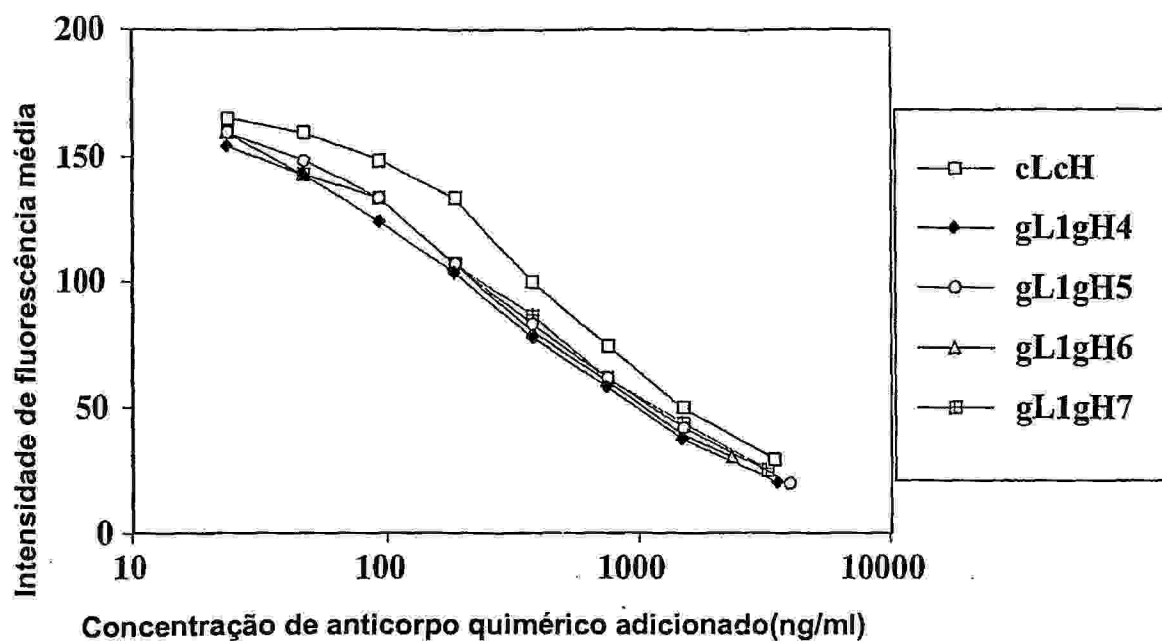


FIG.13**Seqüência de DNA total de cadeias leve e pesada enxertadas.****a) Cadeia pesada**

```

      10          20          30          40          50          60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M   D   F   G   F   S   L   V   F   L   A   L   I   L   K>

      70          80          90          100          110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
G   V   Q   C   E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G>

120          130          140          150          160          170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G   Y   R   F   T   N   Y   W   I>

      180          190          200          210          220          230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
H   W   V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   I   G   G   I   N   P>

      240          250          260          270          280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CGC
G   N   N   Y   A   T   Y   R   R   K   F   Q   G   R   V   T   M   T   A>

290          300          310          320          330          340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
D   T   S   T   S   T   V   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D   T>

      350          360          370          380          390          400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
A   V   Y   Y   C   T   R   E   G   Y   G   N   Y   G   A   W   F   A   Y>

      410          420          430          440          450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V>

460          470          480          490          500          510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG
F   P   L   A   P   C   S   R   S   T   S   E   S   T   A   A   L   G   C>

```


FIG.13**Sequência de DNA total de cadeias leve e pesada enxertadas.****a) Cadeia pesada**

```

      10          20          30          40          50          60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M   D   F   G   F   S   L   V   F   L   A   L   I   L   K>

      70          80          90          100          110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
  G   V   Q   C   E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G>

120          130          140          150          160          170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
  A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G   Y   R   F   T   N   Y   W   I>

      180          190          200          210          220          230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
  H   W   V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   I   G   G   I   N   P>

      240          250          260          270          280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CGC
  G   N   N   Y   A   T   Y   R   R   K   F   Q   G   R   V   T   M   T   A>

290          300          310          320          330          340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
  D   T   S   T   S   T   V   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D   T>

      350          360          370          380          390          400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
  A   V   Y   Y   C   T   R   E   G   Y   G   N   Y   G   A   W   F   A   Y>

      410          420          430          440          450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
  W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V>

460          470          480          490          500          510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG
  F   P   L   A   P   C   S   R   S   T   S   E   S   T   A   A   L   G   C>

```

FIG.13

Sequência de DNA total de cadeias leve e pesada enxertadas.

a) Cadeia pesada

```

      10      20      30      40      50      60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M   D   F   G   F   S   L   V   F   L   A   L   I   L   K>

      70      80      90      100     110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
  G   V   Q   C   E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G>

120      130      140      150      160      170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
  A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G   Y   R   F   T   N   Y   W   I>

      180      190      200      210      220      230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
  H   W   V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   I   G   G   I   N   P>

      240      250      260      270      280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CGC
  G   N   N   Y   A   T   Y   R   R   K   F   Q   G   R   V   T   M   T   A>

290      300      310      320      330      340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
  D   T   S   T   S   T   V   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D   T>

      350      360      370      380      390      400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
  A   V   Y   Y   C   T   R   E   G   Y   G   N   Y   G   A   W   F   A   Y>

      410      420      430      440      450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
  W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V>

460      470      480      490      500      510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG
  F   P   L   A   P   C   S   R   S   T   S   E   S   T   A   A   L   G   C>

```

FIG.13**Sequência de DNA total de cadeias leve e pesada enxertadas.****a) Cadeia pesada**

```

      10          20          30          40          50          60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M   D   F   G   F   S   L   V   F   L   A   L   I   L   K>

      70          80          90          100          110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
  G   V   Q   C   E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G>

120          130          140          150          160          170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
  A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G   Y   R   F   T   N   Y   W   I>

      180          190          200          210          220          230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
  H   W   V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   I   G   G   I   N   P>

      240          250          260          270          280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CCG
  G   N   N   Y   A   T   Y   R   R   K   F   Q   G   R   V   T   M   T   A>

290          300          310          320          330          340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
  D   T   S   T   S   T   V   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D   T>

      350          360          370          380          390          400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
  A   V   Y   Y   C   T   R   E   G   Y   G   N   Y   G   A   W   F   A   Y>

      410          420          430          440          450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
  W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V>

460          470          480          490          500          510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG
  F   P   L   A   P   C   S   R   S   T   S   E   S   T   A   A   L   G   C>

```

FIG.13(cont.)**Sequência de DNA total de cadeias leve e pesada enxertadas.****b) Cadeia leve**

```

      10      20      30      40      50      60
TTCGAAGCCG CCACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT
AAGCTTCGGC GGTGG TAC TTC AAC GGA CAA TCC GAC AAC CAC GAA GAC AAC AAG ACC TAA
      M   K   L   P   V   R   L   L   V   L   L   L   F   W   I>

      70      80      90      100     110
CCT GCT TCC CGG GGT GAC GTT CAA GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT
GGA CGA AGG GCC CCA CTG CAA GTT CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA
P   A   S   R   G   D   V   Q   V   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S>

120      130      140      150      160      170
GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACT TGT AGA TCC AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT
CAT CCT CTG GCC CAG TGG TAG TGA ACA TCT AGG TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA
V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   S   S   Q   S   L   A   N   S   Y>

      180      190      200      210      220      230
GGG AAC ACC TTT TTG TCT TGG TAT CTG CAC AAA CCA GGT AAA GCC CCA CAA TTG CTC
CCC TTG TGG AAA AAC AGA ACC ATA GAC GTG TTT GGT CCA TTT CGG GGT GTT AAC GAG
G   N   T   F   L   S   W   Y   L   H   K   P   G   K   A   P   Q   L   L>

      240      250      260      270      280
ATC TAC GGA ATC TCT AAC AGA TTT AGT GGT GTA CCA GAC AGG TTC AGC GGT TCC GGA
TAG ATG CCT TAG AGA TTG TCT AAA TCA CCA CAT GGT CTG TCC AAG TCG CCA AGG CCT
I   Y   G   I   S   N   R   F   S   G   V   P   D   R   F   S   G   S   G>

290      300      310      320      330      340
AGT GGT ACT GAT TTC ACC CTC ACG ATC TCG TCT CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT
TCA CCA TGA CTA AAG TGG GAG TGC TAG AGC AGA GAG GTC GGT CTT CTA AAG CGG TGA
S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T>

      350      360      370      380      390      400
TAT TAC TGT TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA
ATA ATG ACA AAT GTT CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT
Y   Y   C   L   Q   G   T   H   Q   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   V>

      410      420      430      440      450
GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG
CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC
E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S   D   E>

460      470      480      490      500      510
CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT
Q   L   K   S   G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R>

```

FIG.13(cont.)

520 530 540 550 560 570
 GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG
 CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC
 E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E>

580 590 600 610 620 630
 AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG
 TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC
 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T>

640 650 660 670 680
 CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
 GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q>

690 700 710 720 730 740
 GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG AGGGA
 CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT CTC ACA ATC TCCCT
 G L S S P V T K S F N R G E C *>

750 760 770 780
 GAAGTGCCCC CACCTGCTCC TCAGTTCCAG CCTGGGAATT C
 CTTACAGGGG GTGGACGAGG AGTCAAGGTC GGACCCTTAA G