



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



\* B R 1 2 2 0 2 1 0 0 0 9 2 4 B 1 \*

**(11) BR 122021000924-4 B1**

**(22) Data do Depósito:** 25/02/2013

**(45) Data de Concessão:** 04/07/2023

---

**(54) Título:** POLIPEPTÍDEO, SEU MÉTODO DE FABRICAÇÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA BACTERIANA, DE LEVEDURA OU FÚNGICA, COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA, KIT DE DIAGNÓSTICO, E MÉTODO DE DIAGNÓSTICO

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

**(30) Prioridade Unionista:** 27/02/2012 US 61/603,622.

**(73) Titular(es):** ABLYNX N.V..

**(72) Inventor(es):** SANJAYA SINGH; ALISA K. WATERMAN; ERIK DEPLA; TOON LAEREMANS; DIANE VAN HOORICK; CEDRIC JOZEF NÉOTÈRE VERVERKEN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2013027580 de 25/02/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/130381 de 06/09/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 18/01/2021

**(62) Pedido Original do Dividido:** BR112014021080-2 - 25/02/2013

**(57) Resumo:** A presente invenção refere-se a polipeptídeos de ligação de CX3CR1, em particular polipeptídeos que compreendem domínios de imunoglobulina específicos. A invenção também refere-se a ácidos nucleicos codificando semelhantes polipeptídeos; a métodos para preparar semelhantes polipeptídeos; a células hospedeiras expressando ou capazes de expressar semelhantes polipeptídeos; a composições compreendendo semelhantes polipeptídeos; e a utilizações de semelhantes polipeptídeos ou semelhantes composições, em particular para fins profiláticos, terapêuticos e de diagnóstico.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**POLI-PEPTÍDEO, SEU MÉTODO DE FABRICAÇÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA BACTERIANA, DE LEVEDURA OU FÚNGICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT DE DIAGNÓSTICO, E MÉTODO DE DIAGNÓSTICO**".

Dividido do BR112014021080-2, depositado em 25.02.2013

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere a polipeptídeos de ligação de CX3CR1, em particular polipeptídeos os quais compreendem domínios de imunoglobulina específicos. A invenção também se refere a ácidos nucleicos codificando semelhantes polipeptídeos; a métodos para preparar semelhantes polipeptídeos; a células hospedeiras expressando ou capazes de expressar semelhantes polipeptídeos; a composições compreendendo semelhantes polipeptídeos; e a utilizações de semelhantes polipeptídeos ou semelhantes composições, em particular para fins profiláticos, terapêuticos e de diagnóstico.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A CX3CR1 é uma proteína de membrana integral acoplada à proteína G, a qual é um receptor de quimiocina. É expressada predominantemente sobre tipos celulares tais como monócitos, células dendríticas e células T que têm sido associados com a iniciação e a progressão de placas ateroscleróticas. É hiperregulada em monócitos por lipídeos oxidados e media a migração destas células para dentro e sobrevida dentro das placas. Seu único ligante fractalcina (FKN) é expressado sobre a superfície de células endoteliais vasculares e musculares lisas em lesões onde modula a adesão dos leucócitos. A fractalcina também é liberada na circulação por clivagem proteolítica onde funciona como um agente quimiotático.

[003] Em seres humanos, foi demonstrado que uma variante de CX3CR1 (V249I/T280M) com atividade reduzida está associada com

um menor risco de doença cardiovascular (doença cardíaca coronária, doença cerebrovascular ou doença vascular periférica) (McDermott, 2001; *Circ Res* 89:401), doença das artérias coronárias (evidência angiográfica de estenose) (McDermott, 2003; *J. Clin. Invest.* 111:1241), e doença oclusiva da artéria carótida (Ghilardi, 2004; *Stroke* 35:1276). CX3CR1 colocalizou com fractalcina a qual apresentou aumentada imunocoloração por anticorpos policlonais dentro de placas ateroscleróticas (Wong, 2002 *Cardiovasc. Path.* 11:332). Não foi observada coloração de fractalcina em regiões arteriais não de placas.

[004] Vários estudos genéticos independentes em camundongos demonstraram um defeito benéfico da deficiência de CX3CR1 sobre a aterosclerose. Foi vista uma redução na área de lesão no arco aórtico e na aorta torácica bem como uma redução na acumulação de monócitos/macrófagos nas placas em duas cepas derivadas de modo independente de camundongos CX3CR1<sup>-/-</sup> apoE<sup>-/-</sup> alimentados uma dieta de alto teor de gordura (Combadière, 2003; *Circulation*, 107:1009, Lesnik, 2003; *J. Clin. Invest.* 111:333).

[005] Isto mostra que CX3CR1 está envolvida em doenças cardiovasculares e que a modulação de sua atividade pode proporcionar terapias promissoras. Portanto existe a necessidade de moléculas de antagonistas contra CX3CR1 com propriedades farmacológicas benéficas, as quais podem ser usadas como agentes terapêuticos para tratar doenças, em particular doenças cardiovasculares em seres humanos.

[006] Por conseguinte, um objetivo da presente invenção é proporcionar moléculas de antagonistas anti-CX3CR1, em particular moléculas de antagonistas anti-CX3CR1, as quais têm alta afinidade de ligação para CX3CR1.

[007] Um objetivo adicional da presente invenção é proporcionar moléculas de antagonistas anti-CX3CR1, as quais têm alta especifici-

dade para CX3CR1.

[008] Um objetivo adicional da presente invenção é proporcionar antagonistas anti-CX3CR1, as quais têm potente atividade.

[009] Um objetivo adicional da presente invenção é proporcionar antagonistas anti-CX3CR1, as quais têm uma biodisponibilidade e uma meia-vida favoráveis.

[0010] Um objetivo adicional da presente invenção é proporcionar antagonistas anti-CX3CR1, as quais têm propriedades biofísicas favoráveis.

[0011] Objetivos adicionais da presente invenção incluem combinações de qualquer um dos objetivos estipulados acima.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0012] A invenção proporciona polipeptídeos os quais ligam a CX3CR1 humana e são capazes de bloquear a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana. Em um aspecto, o polipeptídeo é uma imunoglobulina a qual compreende um domínio de ligação antigênica o qual compreende três regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, em que a referida imunoglobulina liga à CX3CR1 humana e é capaz de bloquear a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana. Em um aspecto adicional, o polipeptídeo compreende um ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1, em que o referido polipeptídeo é capaz de bloquear a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana.

[0013] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção é caracterizado por uma ou mais das seguintes propriedades:

- Liga com alta afinidade à CX3CR1 humana;
- Bloqueia a ligação de fractalcina solúvel à CX3CR1 humana;
- Inibe a quimiotaxia induzida pela fractalcina;
- Inibe a internalização de receptores de CX3CR1 humana

induzida pela fractalcina;

[0014] Tem reação cruzada com CX3CR1 cyno dentro de 10 vezes da E/IC<sub>50</sub> para CX3CR1 humana para ligação e inibição funcional.

[0015] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção compreende um domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 e compreende adicionalmente uma porção de prolongamento da meia-vida, por exemplo, uma porção de ligação de albumina, uma molécula de polietileno glicol ou um domínio de Fc. Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção compreende dois ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1. Em um aspecto, os dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 são encadeados de modo covalente por um peptídeo encadeador. Em um aspecto, os dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 em um polipeptídeo da presente invenção têm a mesma sequência de aminoácidos. Em outro aspecto, os dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 em um polipeptídeo da presente invenção têm sequências de aminoácidos diferentes. Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção compreende dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 e compreende adicionalmente uma porção de prolongamento da meia-vida, por exemplo, uma porção de ligação de albumina, uma molécula de polietileno glicol ou um domínio de Fc.

[0016] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção compreende um primeiro domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 ligado de modo covalente a uma porção de ligação de albumina por um primeiro peptídeo encadeador, em que a referida porção de ligação de albumina é adicionalmente ligada de modo covalente a um segundo domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 por um segundo peptídeo encadeador.

[0017] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção

compreende um domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 ligado de modo covalente a um domínio de Fc por um peptídeo encadeador. Em um aspecto, semelhante polipeptídeo compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 ligado de modo covalente a um domínio de Fc por um peptídeo encadeador é proporcionado como um dímero, por exemplo, através de pontes de dissulfeto.

[0018] Os polipeptídeos da presente invenção são usados para a prevenção, o tratamento, a mitigação e/ou o diagnóstico de doenças, distúrbios ou condições associados com CX3CR1, em particular doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose.

[0019] Em um aspecto adicional, a presente invenção proporciona:

[0020] Modalidade 1: Uma imunoglobulina a qual compreende um domínio de ligação antigênica o qual compreende três regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, em que a referida imunoglobulina liga à CX3CR1 humana e é capaz de bloquear a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana.

[0021] Modalidade 2: Um polipeptídeo compreendendo um ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1, em que o referido polipeptídeo é capaz de bloquear a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana.

[0022] Modalidade 3: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 2, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 consiste essencialmente em quatro regiões de framework (FR1, FR2, FR3 e FR4) e três regiões determinantes de complementaridade (CDR1, CDR2 e CDR3).

[0023] Modalidade 4: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 3, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 tem a estrutura FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4.

[0024] Modalidade 5: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 4, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 é um domínio de anticorpo.

[0025] Modalidade 6: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 5, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 é um VH, um VL, um VHH, um VH camelizado, ou um VHH que é otimizado para estabilidade, potência, fabricabilidade e/ou similaridade para regiões de framework humanas.

[0026] Modalidade 7: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 6, em que o referido polipeptídeo tem uma afinidade para CX3CR1 humana a:

[0027] uma EC50 de menos de ou igual a 10 nM, menos de ou igual a 5 nM, menos de ou igual a 2,5 nM ou menos de ou igual a 1 nM, conforme determinado por FACS de ligação celular; ou

[0028] uma IC50 de menos de ou igual a 10 nM, menos de ou igual a 5 nM, menos de ou igual a 2,5 nM ou menos de ou igual a 1 nM, conforme determinado por FACS de competição.

[0029] Modalidade 8: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 7, em que o referido polipeptídeo bloqueia a ligação de fractalina humana à CX3CR1 humana a uma IC50 de menos de ou igual a 300 nM, ou menos de ou igual a 100 nM, ou menos de ou igual a 20 nM, ou menos de ou igual a 10 nM, ou menos de ou igual a 5 nM, ou menos de ou igual a 2,5 nM ou menos de ou igual a 1 nM.

[0030] Modalidade 9: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 8, em que o referido polipeptídeo inibe a quimiotaxia induzida pela fractalina mediada pela CX3CR1 humana a uma IC50 de menos de ou igual a 500 nM, ou de menos de ou igual a 100 nM, ou de menos de ou igual a 75 nM, ou de menos de ou igual a 50 nM, ou menos de ou igual a 10 nM ou menos de ou igual a 5 nM.

[0031] Modalidade 10: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 9, em que o referido polipeptídeo inibe a internalização de fractalcina mediada pela CX3CR1 humana a uma IC50 de menos de ou igual a 10 nM, ou menos de ou igual a 5 nM ou ou menos de ou igual a 1 nM.

[0032] Modalidade 11: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 3 a 10, em que a referida CDR3 tem a sequência de aminoácidos de Asp-Xaa1-Arg-Arg-Gly-Trp-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5 (SEQ ID NO: 197), em que:

[0033] - Xaa1 é Pro, Ala ou Gly;

[0034] - Xaa2 é Asp ou Asn;

[0035] - Xaa3 é Thr ou Ser;

[0036] - Xaa4 é Arg, Lys, Ala ou Gly; e

[0037] - Xaa5 é Tyr ou Phe.

[0038] Modalidade 12: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 3 a 11, em que:

[0039] a)

[0040] - Xaa1 é Pro, Ala ou Gly;

[0041] - Xaa2 é Asp ou Asn;

[0042] - Xaa3 é Thr;

[0043] - Xaa4 é Arg ou Lys; e

[0044] - Xaa5 é Tyr,

[0045] e/ou

[0046] b) em que a referida CDR3 é selecionada entre qualquer uma de SEQ ID No's: 186 a 190.

[0047] Modalidade 13: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 3 a 12, em que a referida CDR3 tem a sequência de aminoácidos de Asp-Pro-Arg-Arg-Gly-Trp-Asp-Thr-Arg-Tyr (SEQ ID NO: 186).

[0048] Modalidade 14: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma

das modalidades 3 a 10, em que:

[0049] a referida CDR1:

[0050] tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 141;

[0051] tem uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 80% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 141;

[0052] tem uma sequência de aminoácidos que tem 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, em que

[0053] - na posição 2 o S foi modificado para T, ou G;

[0054] - na posição 6 o S foi modificado para R;

[0055] - na posição 7 o N foi modificado para T; e/ou

[0056] - na posição 9 o M foi modificado para K; ou

[0057] d) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 141 a 145 e 213;

[0058] a referida CDR2:

[0059] tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 164;

[0060] tem uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 70% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 164;

[0061] tem uma sequência de aminoácidos que tem 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 164, em que

[0062] - na posição 1 o G foi modificado para A, L, V ou S;

[0063] - na posição 3 o N foi modificado para D, S, Q, G ou T;

[0064] - na posição 4 o S foi modificado para T, K, G ou P;

[0065] - na posição 5 o V foi modificado para A;

[0066] - na posição 6 o G foi modificado para D;

[0067] - na posição 7 o I foi modificado para T, ou V;

[0068] - na posição 8 o T foi modificado para A; e/ou

- [0069] - na posição 9 o K foi modificado para R; ou
- [0070] d) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 162 a 175 e 214 a 221; e
- [0071] a referida CDR3:
- [0072] tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 186;
- [0073] tem uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 70% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 186;
- [0074] tem uma sequência de aminoácidos que tem 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 186, em que
- [0075] - na posição 2 o P foi modificado para A, ou G;
- [0076] - na posição 7 o D foi modificado para N; e/ou
- [0077] - na posição 9 o R foi modificado para K; ou
- [0078] d) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 186 a 190.
- [0079] Modalidade 15: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 3 a 10, em que
- [0080] a referida CDR1 tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 146;
- [0081] ii) a referida CDR2 tem uma sequência de aminoácidos que a) tem no mínimo 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 176 ou b) tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 176 ou 177; e
- [0082] a referida CDR3 tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 191.
- [0083] Modalidade 16: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 3 a 10, em que
- [0084] a referida CDR1:
- [0085] tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 147; ou

[0086] tem uma sequência de aminoácidos que tem 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, em que

[0087] - na posição 1 o G foi modificado para K, R, ou A;

[0088] - na posição 2 o T foi modificado para I, P, S ou L;

[0089] - na posição 3 o I foi modificado para V, ou T;

[0090] - na posição 4 o F foi modificado para L;

[0091] - na posição 5 o S foi modificado para R, ou D;

[0092] - na posição 6 o N foi modificado para S, T, ou D; e/ou

[0093] - na posição 7 o N foi modificado para T, ou Y; ou

[0094] c) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 147 a 161;

[0095] ii) a referida CDR2:

[0096] tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 179; ou

[0097] tem uma sequência de aminoácidos que tem 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 179, em que

[0098] - na posição 3 o S foi modificado para T, ou G;

[0099] - na posição 4 o N foi modificado para S, ou I;

[00100] - na posição 5 o S foi modificado para T;

[00101] - na posição 6 o G foi modificado para Y; e/ou

[00102] - na posição 8 o T foi modificado para A; ou

[00103] tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 178 a 185; e

[00104] iii) a referida CDR3:

[00105] tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 192; ou

[00106] tem uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 80% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 192; ou

[00107] tem uma sequência de aminoácidos que tem 2, ou 1 dife-

rença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 192, em que

- [00108] - na posição 2 o A foi modificado para G;
- [00109] - na posição 8 o T foi modificado para S;
- [00110] - na posição 9 o A foi modificado para G; e/ou
- [00111] - na posição 10 o Y foi modificado para F; ou

d) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 192 a 196.

[00112] Modalidade 17: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 3, em que as sequências de aminoácidos das referidas CDR1, CDR2 e CDR3 são estipuladas em:

- [00113] - SEQ ID No: 141, 162 e 186, respectivamente; ou
- [00114] - SEQ ID No: 141, 163 e 187, respectivamente; ou
- [00115] - SEQ ID No: 141, 164 e 186, respectivamente; ou
- [00116] - SEQ ID No: 141, 166 e 186, respectivamente; ou
- [00117] - SEQ ID No: 141, 167 e 186, respectivamente; ou
- [00118] - SEQ ID No: 141, 167 e 189, respectivamente; ou
- [00119] - SEQ ID No: 141, 168 e 186, respectivamente; ou
- [00120] - SEQ ID No: 141, 168 e 187, respectivamente; ou
- [00121] - SEQ ID No: 141, 169 e 190, respectivamente; ou
- [00122] - SEQ ID No: 141, 170 e 186, respectivamente; ou
- [00123] - SEQ ID No: 141, 171 e 186, respectivamente; ou
- [00124] - SEQ ID No: 141, 174 e 186, respectivamente; ou
- [00125] - SEQ ID No: 141, 175 e 187, respectivamente; ou
- [00126] - SEQ ID No: 142, 165 e 188, respectivamente; ou
- [00127] - SEQ ID No: 142, 173 e 188, respectivamente; ou
- [00128] - SEQ ID No: 143, 164 e 186, respectivamente; ou
- [00129] - SEQ ID No: 144, 172 e 187, respectivamente; ou
- [00130] - SEQ ID No: 145, 172 e 187, respectivamente; ou
- [00131] - SEQ ID No: 141, 214 e 186, respectivamente; ou

- [00132] - SEQ ID No: 141, 215 e 186, respectivamente; ou
- [00133] - SEQ ID No: 141, 216 e 186, respectivamente; ou
- [00134] - SEQ ID No: 141, 217 e 186, respectivamente; ou
- [00135] - SEQ ID No: 141, 218 e 186, respectivamente; ou
- [00136] - SEQ ID No: 141, 219 e 186, respectivamente; ou
- [00137] - SEQ ID No: 141, 220 e 186, respectivamente; ou
- [00138] - SEQ ID No: 213, 221 e 186, respectivamente; ou
- [00139] - SEQ ID No: 213, 214 e 186, respectivamente.
- [00140] Modalidade 18: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 3, em que as sequências de aminoácidos das referidas CDR1, CDR2 e CDR3 são estipuladas em:
  - [00141] - SEQ ID No: 146, 176 e 191, respectivamente; ou
  - [00142] - SEQ ID No: 146, 177 e 191, respectivamente.
- [00143] Modalidade 19: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 3, em que as sequências de aminoácidos das referidas CDR1, CDR2 e CDR3 são estipuladas em:
  - [00144] - SEQ ID No: 147, 178 e 192, respectivamente; ou
  - [00145] - SEQ ID No: 147, 179 e 192, respectivamente; ou
  - [00146] - SEQ ID No: 147, 179 e 194, respectivamente; ou
  - [00147] - SEQ ID No: 148, 179 e 193, respectivamente; ou
  - [00148] - SEQ ID No: 149, 179 e 192, respectivamente; ou
  - [00149] - SEQ ID No: 149, 180 e 192, respectivamente; ou
  - [00150] - SEQ ID No: 149, 181 e 192, respectivamente; ou
  - [00151] - SEQ ID No: 149, 183 e 192, respectivamente; ou
  - [00152] - SEQ ID No: 149, 185 e 192, respectivamente; ou
  - [00153] - SEQ ID No: 150, 179 e 194, respectivamente; ou
  - [00154] - SEQ ID No: 150, 182 e 194, respectivamente; ou
  - [00155] - SEQ ID No: 151, 179 e 193, respectivamente; ou
  - [00156] - SEQ ID No: 151, 182 e 194, respectivamente; ou
  - [00157] - SEQ ID No: 151, 184 e 196, respectivamente; ou

- [00158] - SEQ ID No: 152, 179 e 195, respectivamente; ou
- [00159] - SEQ ID No: 153, 179 e 194, respectivamente; ou
- [00160] - SEQ ID No: 154, 182 e 194, respectivamente; ou
- [00161] - SEQ ID No: 155, 179 e 195, respectivamente; ou
- [00162] - SEQ ID No: 156, 181 e 192, respectivamente; ou
- [00163] - SEQ ID No: 157, 179 e 194, respectivamente; ou
- [00164] - SEQ ID No: 158, 179 e 192, respectivamente; ou
- [00165] - SEQ ID No: 159, 178 e 192, respectivamente; ou
- [00166] - SEQ ID No: 160, 179 e 194, respectivamente; ou
- [00167] - SEQ ID No: 161, 179 e 194, respectivamente.
- [00168] Modalidade 20: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 3, em que as sequências de aminoácidos das referidas CDR1, CDR2 e CDR3 são estipuladas em: SEQ ID NO's: 141, 164 e 186, respectivamente, ou SEQ ID NO's: 141, 162 e 186, respectivamente.
- [00169] Modalidade 21: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 3, em que as sequências de aminoácidos das referidas CDR1, CDR2 e CDR3 são estipuladas em: SEQ ID NO's: 213, 214 e 186 respectivamente, SEQ ID NO's: 213, 221 e 186 respectivamente, ou SEQ ID NO's: 141, 162 e 186 respectivamente.
- [00170] Modalidade 22: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 10, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 é um domínio VHH compreendendo a sequência estipulada em:
- [00171] a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- [00172] sequências de aminoácidos que têm no mínimo 90% de identidade de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- [00173] sequências de aminoácidos que têm 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; ou

[00174] uma sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 48, 121 a 140 ou 222 a 224.

[00175] Modalidade 23: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 10, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 é um domínio VHH compreendendo a sequência estipulada em:

[00176] a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49;

[00177] uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 95% de identidade de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 49;

[00178] uma sequência de aminoácidos que tem 5, 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; ou

[00179] uma sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 49 a 52.

[00180] Modalidade 24: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 10, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 é um domínio VHH compreendendo a sequência estipulada em:

[00181] a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67;

[00182] uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 90% de identidade de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 67;

[00183] uma sequência de aminoácidos que tem 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; ou

[00184] uma sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 53 a 120.

[00185] Modalidade 25: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 2, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina

anti-CX3CR1 compreende a sequência estipulada em SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3.

[00186] Modalidade 26: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 2, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 compreende a sequência estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO: 121 a 140 ou SEQ ID NO: 222 a 224.

[00187] Modalidade 27: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades acima, o qual é humanizado e/ou otimizado para estabilidade, potência, fabricabilidade e/ou similaridade para regiões de framework humanas.

[00188] Modalidade 28: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 27, o qual é humanizado e/ou tem otimização de sequência em uma ou mais das seguintes posições (de acordo com numeração Kabat): 1, 11, 14, 16, 74, 83, 108.

[00189] Modalidade 29: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 28, compreendendo uma ou mais das seguintes mutações: E1D, S11L, A14P, E16G, A74S, K83R, Q108L.

[00190] Modalidade 30: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 3 a 29, no qual:

[00191] FR1 é selecionado entre SEQ ID NO's: 198 a 204;

[00192] ii) FR2 é selecionado entre SEQ ID NO's: 205 a 208;

[00193] iii) FR3 é selecionado entre SEQ ID NO's: 209 a 210; e/ou

[00194] FR4 é selecionado entre SEQ ID NO's: 211 a 212.

[00195] Modalidade 31: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 3 a 30, o qual é humanizado e/ou tem otimização de sequência em uma ou mais das seguintes posições (de acordo com numeração Kabat): 52, 53.

[00196] Modalidade 32: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 31, compreendendo uma ou mais das seguintes mutações: N52S, S53T.

[00197] Modalidade 33: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 3 a 32, no qual CDR2 é selecionada entre SEQ ID NO's: 214 a 221.

[00198] Modalidade 34: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2-33, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 compreende a sequência estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO's: 138 a 140 ou 222 a 224.

[00199] Modalidade 35: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 22 a 26, em que o referido domínio VHH consiste em qualquer uma das referidas sequências de aminoácidos.

[00200] Modalidade 36: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 35, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina bloqueia a ligação de no mínimo um dos domínios variáveis únicos de imunoglobulina de SEQ ID NO's: 1 a 120, 121 a 140 e 222 a 224 a CX3CR1.

[00201] Modalidade 37: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 35, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina é bloqueado de \*ligação a CX3CR1 por no mínimo uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NO's: 1 a 120, 121 a 140 e 222 a 224.

[00202] Modalidade 38: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 37, em que o polipeptídeo compreende adicionalmente uma porção de prolongamento da meia-vida.

[00203] Modalidade 39: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 38, em que a referida porção de prolongamento da meia-vida é ligada de modo covalente ao referido polipeptídeo e é selecionada entre o grupo consistindo em uma porção de ligação de albumina, tal como um domínio de imunoglobulina anti-albumina, uma porção de ligação de transferrina, tal como um domínio de imunoglobulina anti-transferrina, uma molécula de polietileno glicol, uma molécula de polie-

tileno glicol recombinante, albumina sérica humana, um fragmento de albumina sérica humana, um peptídeo de ligação de albumina ou um domínio de Fc.

[00204] Modalidade 40: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 38 ou 39, em que a referida porção de prolongamento da meia-vida consiste em um domínio variável único de imunoglobulina anti-albumina.

[00205] Modalidade 41: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 40, em que o domínio variável único de imunoglobulina é selecionado entre um domínio VHH, um domínio VHH humanizado, um domínio VH camelizado, um anticorpo de domínio, um anticorpo de domínio único e/ou "dAb"s.

[00206] Modalidade 42: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 41, em que o domínio variável único de imunoglobulina anti-albumina é selecionado entre SEQ ID NO's: 230 a 232.

[00207] Modalidade 43: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 39, em que o referido polipeptídeo é ligado a uma porção Fc (tal como um Fc humano, por exemplo, conforme estipulado em SEQ ID NO: 252), opcionalmente através de um encadeador adequado ou uma região de articulação.

[00208] Modalidade 44: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 39, em que o referido polipeptídeo é ligado adicionalmente a um ou mais domínios constantes (por exemplo, 2 ou 3 domínios constantes que podem ser usados como parte de/para formar uma porção Fc), a uma porção Fc e/ou a uma ou mais partes de anticorpo, fragmentos ou domínios que conferem uma ou mais funções efetoras ao polipeptídeo da invenção e/ou podem conferir a capacidade para ligar a um ou mais receptores de Fc, opcionalmente através de um encadeador adequado ou uma região de articulação.

[00209] Modalidade 45: Um polipeptídeo de acordo com qualquer

uma das modalidades 2 a 37, em que o referido polipeptídeo compreende adicionalmente um segundo domínio variável único de imunoglobulina, preferencialmente um segundo domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1.

[00210] Modalidade 46: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 45, em que o referido primeiro e o referido segundo domínios variáveis únicos de imunoglobulina são encadeados de modo covalente por um peptídeo encadeador.

[00211] Modalidade 47: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 45 ou 46, em que os referidos segundos domínios variáveis únicos de imunoglobulina essencialmente consistem em quatro regiões de framework (FR1 a FR4) e três regiões determinantes de complementaridade (CDR1 a CDR3).

[00212] Modalidade 48: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 47, em que o referido primeiro e o referido segundo domínios variáveis únicos de imunoglobulina são domínios de anticorpo.

[00213] Modalidade 49: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 48, em que os referidos primeiro e segundo domínios variáveis únicos de imunoglobulina são um VH, um VL, um VHH, um VH camelizado, ou um VHH que é otimizado para estabilidade, potência, fabricabilidade e/ou similaridade para regiões de framework humanas.

[00214] Modalidade 50: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 49, em que as referidas CDR1 a CDR3 do referido domínio variável único de imunoglobulina são estipuladas em qualquer uma das modalidades 11 a 21.

[00215] Modalidade 51: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 50, em que o referido primeiro e o referido segundo domínios variáveis únicos de imunoglobulina compreendem a

mesma CDR3.

[00216] Modalidade 52: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 51, em que a referida CDR3 é estipulado em qualquer uma das modalidades 11 a 13.

[00217] Modalidade 53: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 53, em que o referido primeiro e o referido segundo domínios variáveis únicos de imunoglobulina compreendem as mesmas CDR1, CDR2 e CDR3.

[00218] Modalidade 54: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 53, em que as referidas CDR1 a CDR3 são estipulados em qualquer uma das modalidades 11 a 21.

[00219] Modalidade 55: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 54, em que o referido primeiro e o referido segundo domínios variáveis únicos de imunoglobulina compreendem o mesmo domínio VHH.

[00220] Modalidade 56: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 55, em que o referido domínio VHH é estipulado em qualquer uma das modalidades 22 a 37.

[00221] Modalidade 57: Um polipeptídeo compreendendo um primeiro domínio variável único de imunoglobulina o qual compreende a CDR1, a CDR2 e a CDR3 estipuladas em SEQ ID NO's: 141, 164 e 186 ou SEQ ID NO's: 141, 162 e 186 e um segundo domínio variável único de imunoglobulina conforme estipulado em qualquer uma das modalidades 2 a 37.

[00222] Um polipeptídeo semelhante pode em particular ser um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 56.

[00223] Modalidade 58: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 57, em que o referido primeiro domínio variável único de imunoglobulina compreende a CDR1, a CDR2 e a CDR3 estipuladas em SEQ ID NO's: 213, 214 e 186, SEQ ID NO's: 213, 221 e 186 ou SEQ

ID NO's: 141, 162 e 186.

[00224] Modalidade 59: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 57 ou 58, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina compreende a CDR1, a CDR2 e a CDR3 estipuladas em SEQ ID NO's: 141, 164 e 186 ou SEQ ID NO's: 141, 162 e 186.

[00225] Modalidade 60: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 57 ou 58, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina compreende a CDR1, a CDR2 e a CDR3 estipuladas em: SEQ ID NO's: 213, 214 e 186, SEQ ID NO's: 213, 221 e 186 ou SEQ ID NO's: 141, 162 e 186.

[00226] Modalidade 61: Um polipeptídeo compreendendo um primeiro domínio variável único de imunoglobulina, em que o referido primeiro domínio variável único de imunoglobulina é um domínio VHH compreendendo a sequência estipulada em SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 e um segundo domínio variável único de imunoglobulina de acordo com qualquer uma das modalidades 2 a 37.

[00227] Um polipeptídeo semelhante pode em particular ser um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 60.

[00228] Modalidade 62: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 61, em que o referido primeiro domínio variável único de imunoglobulina é um domínio VHH compreendendo a sequência estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO: 121 a 140 ou 222 a 224.

[00229] Modalidade 63: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 61 ou 62, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina é um domínio VHH compreendendo a sequência estipulada em SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3.

[00230] Modalidade 64: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 63, em que o referido domínio variável único de imunoglobulina é um domínio VHH compreendendo a sequência estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO: 121 a 140 ou 222 a 224.

[00231] Modalidade 65: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 64, em que o polipeptídeo compreende adicionalmente uma porção de prolongamento da meia-vida.

[00232] Modalidade 66: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 65, em que a referida porção de prolongamento da meia-vida é ligada de modo covalente ao referido polipeptídeo e é selecionada entre o grupo consistindo em uma porção de ligação de albumina, tal como um domínio de imunoglobulina anti-albumina, uma porção de ligação de transferrina, tal como um domínio de imunoglobulina anti-transferrina, uma molécula de polietileno glicol, uma molécula de polietileno glicol recombinante, albumina sérica humana, um fragmento de albumina sérica humana, um peptídeo de ligação de albumina ou um domínio de Fc.

[00233] Modalidade 67: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 66, em que a referida porção de prolongamento da meia-vida consiste em um domínio variável único de imunoglobulina anti-albumina.

[00234] Modalidade 68: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 67, em que o domínio variável único de imunoglobulina é selecionado entre um domínio VHH, um domínio VHH humanizado, um domínio VH camelizado, um anticorpo de domínio, um anticorpo de domínio único e/ou "dAb"s.

[00235] Modalidade 69: Um polipeptídeo de acordo com a modalidade 68, em que o domínio variável único de imunoglobulina anti-albumina é selecionado entre SEQ ID NO's: 230 a 232.

[00236] Modalidade 70: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 64, em que o referido polipeptídeo é ligado a uma porção Fc (tal como um Fc humano, por exemplo, conforme estipulado em SEQ ID NO: 252), opcionalmente através de um encadeador adequado ou uma região de articulação.

[00237] Modalidade 71: Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 45 a 66, em que o referido polipeptídeo é ligado adicionalmente a um ou mais domínios constantes (por exemplo, 2 ou 3 domínios constantes que podem ser usados como parte de/para formar uma porção Fc), a uma porção Fc e/ou a uma ou mais partes de anticorpo, fragmentos ou domínios que conferem uma ou mais funções efetoras ao polipeptídeo da invenção e/ou podem conferir a capacidade para ligar a um ou mais receptores de Fc, opcionalmente através de um encadeador adequado ou uma região de articulação.

[00238] Modalidade 72: Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 225 a 227.

[00239] Modalidade 73: Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 249 ou 277 a 281.

[00240] Modalidade 74: Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 257 a 262.

[00241] Modalidade 75: Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 253 ou 254.

[00242] Modalidade 76: Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 263 ou 266.

[00243] Modalidade 77: Um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 267 a 276 e 282.

[00244] Modalidade 78: Uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma região codificando um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77.

[00245] Modalidade 79: Um vetor de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucléico de acordo com a modalidade 78.

[00246] Modalidade 80: Uma célula hospedeira que carrega um vetor de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucléico, a

referida molécula de ácido nucléico compreendendo uma região codificando um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77, em que a referida célula hospedeira é capaz de expressar um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77, e em que a referida célula hospedeira é uma célula procariótica ou uma célula eucariótica.

[00247] Modalidade 81: Uma composição farmacêutica compreendendo (i) como o ingrediente ativo, um ou mais polipeptídeos de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77, e (ii) um veículo farmacêuticamente aceitável, e opcionalmente (iii) um diluente, um excipiente, um adjuvante e/ou um estabilizante.

[00248] Modalidade 82: Um método de fabricar um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77, compreendendo as etapas de

[00249] - cultivar uma célula hospedeira sob condições que permitem a expressão de um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77,

[00250] em que a referida célula hospedeira que carrega um vetor de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucléico, a referida molécula de ácido nucléico compreendendo uma região codificando um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77, e em que a referida célula hospedeira é uma célula procariótica ou uma célula eucariótica;

[00251] - recuperar o referido polipeptídeo; e

[00252] - purificar o referido polipeptídeo.

[00253] Modalidade 83: Um método de usar um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77 para o tratamento, a prevenção ou a mitigação de uma doença, um distúrbio ou uma condição, em particular em um ser humano.

[00254] Modalidade 84: O método da modalidade 83, em que a re-

ferida doença, o referido distúrbio ou a referida condição é uma doença, um distúrbio ou uma condição associada com CX3CR1.

[00255] Modalidade 85: O método da modalidade 83, em que a referida doença, o referido distúrbio ou a referida condição é aterosclerose.

[00256] Modalidade 86: Uma composição farmacêutica injetável compreendendo o polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77, a referida composição sendo adequada para injeção intravenosa ou subcutânea em um ser humano.

[00257] Modalidade 87: Um método para prevenir e/ou tratar uma doença ou um distúrbio que é associado com CX3CR1, em que o referido método compreende administrar a um indivíduo que necessite do mesmo uma quantidade farmacologicamente ativa de no mínimo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77.

[00258] Modalidade 88: Um método da modalidade 85, adicionalmente compreendendo administrar um agente terapêutico adicional selecionado entre o grupo consistindo em uma estatina, um antiplaquetário, um anticoagulante, um antidiabético e um anti-hipertensivo.

[00259] Modalidade 89: Um método para inibir a ligação de CX3CR1 à fractalcina em uma célula de mamífero, compreendendo administrar à célula um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77, por meio do qual é inibida a sinalização mediada pela fractalcina.

[00260] Modalidade 90: Um método para detectar e/ou quantificar níveis de CX3CR1 em uma amostra biológica contactando a amostra com um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77 e detectando a ligação do polipeptídeo com CX3CR1.

[00261] Modalidade 91: Um método para diagnosticar um distúrbio associado com CX3CR1 ou para determinar se um indivíduo tem um risco aumentado de desenvolver um distúrbio associado com

CX3CR1, em que o método compreende contatar uma amostra biológica de um indivíduo com um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77 e detectar a ligação do polipeptídeo a CX3CR1 para determinar a expressão ou concentração de CX3CR1.

[00262] Modalidade 92. Um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77 para utilização no tratamento, na prevenção ou na mitigação de uma doença, um distúrbio ou uma condição, em um ser humano.

[00263] Modalidade 93. O polipeptídeo para uso de acordo com a modalidade 92, em que a doença, o distúrbio ou a condição é uma doença, um distúrbio ou uma condição associada com CX3CR1.

[00264] Modalidade 94. O polipeptídeo para uso de acordo com a modalidade 92, em que a doença, o distúrbio ou a condição é selecionado entre distúrbios ateroscleróticos cardio- e cerebrovasculares, doença arterial periférica, restenose, nefropatia diabética, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescente humana, nefropatia por IgA, nefropatia membranosa, nefrite lúpica, vasculite incluindo púrpura de Henoch-Schonlein e granulomatose de Wegener, artrite reumatoide, osteoartrite, rejeição de aloenxerto, esclerose sistêmica, distúrbios neurodegenerativos e doença desmielinizante, esclerose múltipla (em inglês, MS), mal de Alzheimer, doenças pulmonares tais como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, dor neuropática, dor inflamatória, ou câncer.

[00265] Modalidade 95. O polipeptídeo para uso de acordo com a modalidade 92, em que a doença, o distúrbio ou a condição é aterosclerose.

[00266] Modalidade 96. Uso de um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77 para a fabricação de um medicamento para o tratamento, a prevenção ou a mitigação de uma doença, um distúrbio ou uma condição, em um ser humano.

[00267] Modalidade 97. O método de acordo com a modalidade 87, em que a doença ou o distúrbio é selecionado entre distúrbios ateroscleróticos cardio- e cerebrovasculares, doença arterial periférica, restenose, nefropatia diabética, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescente humana, nefropatia por IgA, nefropatia membranosa, nefrite lúpica, vasculite incluindo púrpura de Henoch-Schonlein e granulomatose de Wegener, artrite reumatoide, osteoartrite, rejeição de aloenxerto, esclerose sistêmica, distúrbios neurodegenerativos e doença desmielinizante, esclerose múltipla (em inglês, MS), mal de Alzheimer, doenças pulmonares tais como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, dor neuropática, dor inflamatória, ou câncer.

[00268] Modalidade 98. O método de acordo com a modalidade 87, em que a doença, o distúrbio ou a condição é aterosclerose.

[00269] Modalidade 99. Um kit de diagnóstico ou um método de diagnóstico compreendendo um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 77, ou o uso do mesmo.

[00270] Modalidade 100. Um kit de diagnóstico ou um método de diagnóstico de acordo com a modalidade 99, para o diagnóstico de no mínimo um de distúrbios ateroscleróticos cardio- e cerebrovasculares, doença arterial periférica, restenose, nefropatia diabética, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescente humana, nefropatia por IgA, nefropatia membranosa, nefrite lúpica, vasculite incluindo púrpura de Henoch-Schonlein e granulomatose de Wegener, artrite reumatoide, osteoartrite, rejeição de aloenxerto, esclerose sistêmica, distúrbios neurodegenerativos e doença desmielinizante, esclerose múltipla (em inglês, MS), mal de Alzheimer, doenças pulmonares tais como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, dor neuropática, dor inflamatória, ou câncer.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### **Definições**

[00271] Os aspectos e modalidades acima e outros da invenção se tornarão evidentes a partir da descrição que se segue aqui, neste requerimento de patente, na qual:

[00272] A menos que indicado ou definido de modo diverso, todos os termos usados têm seu significado usual na técnica, o qual será evidente para a pessoa versada. É feita referência, por exemplo, aos manuais de rotina, tais como Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990), e Roitt et al., "Immunology" (2<sup>nd</sup> Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989), bem como aos antecedentes gerais da técnica citados aqui, neste requerimento de patente; Além disso, a menos que indicado de modo diverso, todos os métodos, etapas, técnicas e manipulações que não são especificamente descritos em detalhes podem ser realizados e foram realizados em uma maneira conhecida *per se*, conforme será evidente para a pessoa versada. Novamente é feita referência, por exemplo, aos manuais de rotina, aos antecedentes gerais da técnica referidos acima e às referências adicionais citadas nos mesmos;

[00273] b) A menos que indicado de modo diverso, os termos "*imunoglobulina*" e "*sequência de imunoglobulina*" - quer usado aqui, neste requerimento de patente, para se referir a um *anticorpo de cadeia pesada* ou a um *anticorpo de 4 cadeias convencional* - são usados como termos gerais de modo a incluir tanto o anticorpo de tamanho completo, as cadeias individuais do mesmo, bem como todas as partes, domínios ou fragmentos do mesmo (incluindo mas não limitados a domínios ou fragmentos de ligação antigênica tais como domínios VHH ou domínios VH/VL, respectivamente). Além disso, o termo "sequência" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, (por exemplo, em termos como "sequência de imunoglobulina", "sequência de anti-

corpo", "sequência de domínio variável (único)", "sequência de VHH" ou "sequência de proteína"), serão entendidos de modo geral como incluindo tanto a sequência de aminoácidos relevante bem como sequências de ácido nucléico ou sequências de nucleotídeos codificando as mesmas, a menos que o contexto exija uma interpretação mais limitada;

[00274] c) O termo "*domínio*" (de um polipeptídeo ou uma proteína) conforme usado aqui, neste requerimento de patente, se refere a uma estrutura de proteína dobrada a qual tem a capacidade de conservar sua estrutura terciária independentemente do resto da proteína. De modo geral, os domínios são responsáveis por propriedades funcionais distintas das proteínas, e em muitos casos podem ser adicionados, removidos ou transferidos para outras proteínas sem perda de função do restante da proteína e/ou do domínio.

[00275] d) O termo "*domínio de imunoglobulina*" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, se refere a uma região globular de uma cadeia de anticorpo (tal como por exemplo, uma cadeia de um anticorpo de 4 cadeias convencional ou de um anticorpo de cadeia pesada), ou a um polipeptídeo que essencialmente consiste em uma região globular semelhante. Os domínios de imunoglobulina são caracterizados pelo fato de que conservam a dobra de imunoglobulina característica de moléculas de anticorpos, a qual consiste em um sanduíche de 2 camadas de cerca de 7 filamentos beta antiparalelos dispostos em duas beta-sheets, opcionalmente estabilizados por uma ligação de dissulfeto conservada.

[00276] e) O termo "*domínio variável de imunoglobulina*" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, significa um domínio de imunoglobulina essencialmente consistindo em quatro "regiões de framework" as quais são referidas na técnica e nas partes que se seguem como "região de framework 1" ou "FR1"; como "região de fra-

mework 2" ou "FR2"; como "região de framework 3" ou "FR3"; e como "região de framework 4" ou "FR4", respectivamente; cujas regiões de framework são interrompidas por três "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDRs", as quais são referidas na técnica e nas partes que se seguem como "região determinante de complementaridade 1" ou "CDR1"; como "região determinante de complementaridade 2" ou "CDR2"; e como "região determinante de complementaridade 3" ou "CDR3", respectivamente. Portanto, a estrutura geral ou sequência de um domínio variável de imunoglobulina pode ser indicada como se segue: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. São o um ou mais domínios variáveis de imunoglobulina que conferem especificidade a um anticorpo para o antígeno carregando o sítio de ligação antigênica.

[00277] f) Os termos "*domínio variável único de imunoglobulina*" e "*domínio variável único*" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, significam um domínio variável de imunoglobulina o qual é capaz de ligar especificamente a um epítipo do antígeno sem pareamento com um domínio variável de imunoglobulina adicional. Um exemplo de domínios variáveis únicos de imunoglobulina no significado da presente invenção são "*anticorpos de domínio*", tais como os domínios variáveis únicos de imunoglobulina VH e VL (domínios VH e domínios VL). Outro exemplo de domínios variáveis únicos de imunoglobulina são "*domínios VHH*" (ou simplesmente "VHHs") de camelídeos, conforme definido nas partes que se seguem.

[00278] Em vista da definição acima, o domínio de ligação antigênica de um anticorpo de 4 cadeias convencional (tal como uma molécula de IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE; conhecida na técnica) ou de um fragmento Fab, um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv tal como um fragmento Fv ligado por dissulfeto ou um fragmento scFv, ou um diabody (todos conhecidos na técnica) derivado a partir de um semelhante anti-

corpo de 4 cadeias convencional, normalmente não seria considerado como um domínio variável único de imunoglobulina, uma vez que, nestes casos, normalmente não ocorreria a ligação ao respectivo epítotope de um antígeno por um (único) domínio de imunoglobulina mas por um par de domínios de imunoglobulina (em associação) tais como domínios variáveis de cadeias leve e pesada, isto é, por um par VH-VL de domínios de imunoglobulina, os quais conjuntamente ligam a um epítotope do respectivo antígeno.

[00279] f1) "*Domínios VHH*", também conhecidos como VHHs, domínios V<sub>H</sub>H, VHH fragmentos de anticorpos, e anticorpos VHH, foram descritos originalmente como o domínio (variável) de imunoglobulina de ligação antigênica de "anticorpos de cadeia pesada" (isto é, de "anticorpos destituídos de cadeias leves"; Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: "*Naturally occurring antibodies devoid of light chains*"; Nature 363, 446-448 (1993)). O termo "domínio VHH" foi escolhido de modo a distinguir estes domínios variáveis dos domínios variáveis de cadeia pesada que estão presentes em anticorpos de 4 cadeias convencionais (os quais são referidos aqui, neste requerimento de patente, como "domínios V<sub>H</sub>" ou "domínios VH") e dos domínios variáveis de cadeia leve que estão presentes em anticorpos de 4 cadeias convencionais (os quais são referidos aqui, neste requerimento de patente, como "domínios V<sub>L</sub>" ou "domínios VL"). Os domínios VHH podem ligar especificamente a um epítotope sem um domínio de ligação de antígeno adicional (ao contrário de domínios VH ou VL em um anticorpo de 4 cadeias convencional, em cujo caso o epítotope é reconhecido por um domínio VL junto com um domínio VH). Os domínios VHH são unidades pequenas, robustas e eficientes de reconhecimento antigênico formadas por um único domínio de imunoglobulina.

[00280] No contexto da presente invenção, os termos domínio VHH,

VHH, domínio V<sub>H</sub>H, fragmento de anticorpo VHH, anticorpo VHH, bem como "Nanobody<sup>®</sup>" e "domínio Nanobody<sup>®</sup>" ("Nanobody" sendo uma marca registrada da empresa Ablynx N.V.; Ghent; Bélgica) são usados de modo intercambiável e são típicos de domínios variáveis únicos de imunoglobulina (tendo a estrutura: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 e ligando especificamente a um epítotope sem necessitar da presença de um segundo domínio variável de imunoglobulina), e os quais são distinguidos de domínios VH pelos chamados "resíduos de *hallmark*", conforme definido, por exemplo, na publicação de patente internacional No. WO2009/109635, Fig. 1.

[00281] Os resíduos aminoácido de um domínio VHH são numerados de acordo com a numeração geral para domínios V<sub>H</sub> proporcionada por Kabat et al. ("Sequência de proteínas de interesse imunológico" ("*Sequence of proteins of immunological interest*"))", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicação No. 91), conforme aplicado aos domínios VHH de Camelídeos, conforme mostrado por exemplo, na Figura 2 de Riechmann e Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). De acordo com esta numeração,

[00282] - FR1 compreende os resíduos aminoácido nas posições 1 a 30,

[00283] - CDR1 compreende os resíduos aminoácido nas posições 31 a 35,

[00284] - FR2 compreende os aminoácidos nas posições 36 a 49,

[00285] - CDR2 compreende os resíduos aminoácido nas posições 50 a 65,

[00286] - FR3 compreende os resíduos aminoácido nas posições 66 a 94,

[00287] - CDR3 compreende os resíduos aminoácido nas posições 95 a 102, e

[00288] - FR4 compreende os resíduos aminoácido nas posições

103 a 113.

[00289] No entanto, deve ser observado que - conforme é de conhecimento geral na técnica para domínios V<sub>H</sub> e para domínios VHH - o número total de resíduos aminoácido em cada uma das CDRs pode variar e pode não corresponder ao número total de resíduos aminoácido indicados pela numeração Kabat (isto é, uma ou mais posições de acordo com a numeração Kabat podem não estar ocupadas na sequência real, ou a sequência real pode conter mais resíduos aminoácido do que o número permitido pela numeração Kabat). Isto significa que, de modo geral, a numeração de acordo com Kabat pode ou não corresponder à numeração real dos resíduos aminoácido na sequência real.

[00290] Métodos alternativos para a numeração dos resíduos aminoácido de domínios V<sub>H</sub>, cujos métodos também podem ser aplicados em uma maneira análoga para domínios VHH, são conhecidos na técnica. No entanto, nas presentes descrição, reivindicações e figuras, será seguida a numeração de acordo com Kabat e aplicada aos domínios VHH conforme descrito acima, a menos que indicado de modo diverso.

[00291] O número total de resíduos aminoácido em um domínio VHH geralmente será na faixa de a partir de 110 até 120, frequentemente entre 112 e 115. No entanto, deve ser observado que sequências menores e mais longas também podem ser adequadas para os fins descritos aqui, neste requerimento de patente.

[00292] Características estruturais e propriedades funcionais adicionais de domínios VHH e polipeptídeos contendo as mesmas podem ser resumidas como se segue:

[00293] Domínios VHH (os quais tenham sido "projetados" pela natureza para ligarem funcionalmente a um antígeno sem a presença de, e sem qualquer interação com, um domínio variável de cadeia leve)

podem funcionar como uma única e relativamente pequena unidade estrutural, como um domínio ou como um polipeptídeo de ligação anti-gênica funcional. Isto distingue os domínios VHH dos domínios VH e VL de anticorpos de 4 cadeias convencionais, os quais por si só de modo geral não são adequados para aplicação prática como proteínas de ligação antigênica única ou domínios variáveis únicos de imunoglobulina, mas precisam ser combinados em alguma forma ou outra de modo a proporcionar uma unidade de ligação antigênica funcional (como por exemplo, em fragmentos de anticorpos convencionais tais como fragmentos Fab; em scFv's, os quais consistem em um domínio VH ligado de modo covalente a um domínio VL).

[00294] Devido a estas propriedades únicas, o uso de domínios VHH - ou isolados ou como parte de um polipeptídeo maior - oferece uma série de vantagens significativas em relação ao uso de convencionais domínios VH e VL, scFv's ou fragmentos de anticorpos convencionais (tais como fragmentos Fab ou F(ab')<sub>2</sub>):

[00295] - somente um único domínio é necessário para ligar um antígeno com alta afinidade e com alta seletividade, de modo que não há nenhuma necessidade de ter dois domínios separados presentes, nem de assegurar que estes dois domínios estejam presentes na conformação espacial e na configuração corretas (isto é, através do uso de encadeadores especialmente projetados, conforme com scFv's);

[00296] - domínios VHH podem ser expressados a partir de um único gene e não necessitam de dobra pós-translacional ou modificações;

[00297] - domínios VHH podem ser facilmente manipulados para formatos multivalentes e multiespecíficos (conforme adicionalmente discutido aqui, neste requerimento de patente);

[00298] - domínios VHH são altamente solúveis e não têm uma tendência para agregar (conforme com os domínios de ligação antigênica derivados de camundongo descritos por Ward et al., Nature 341: 544-

546 (1989));

[00299] - domínios VHH são altamente estáveis ao calor, pH, proteases e outras condições ou agentes desnaturantes e, portanto, podem ser preparados, armazenados ou transportados sem o uso de equipamentos de refrigeração, transferindo uma economia de custos, de tempo e ambiental;

[00300] - domínios VHH são fáceis e relativamente baratos de preparar, mesmo em uma escala requerida para produção. Por exemplo, domínios VHH e polipeptídeos contendo os mesmos podem ser produzidos usando fermentação microbiana (por exemplo, conforme adicionalmente descrito abaixo) e não requerem o uso de sistemas de expressão de mamíferos, conforme com, por exemplo, fragmentos de anticorpos convencionais;

[00301] - domínios VHH são relativamente pequenos (aproximadamente 15 kDa, ou 10 vezes menores do que uma IgG convencional) comparados com anticorpos de 4 cadeias convencionais e fragmentos de ligação antigênica dos mesmos, e portanto

[00302] -- apresentam alta(maior) penetração em tecidos e

[00303] -- podem ser administrados em maiores doses

[00304] do que os referidos anticorpos de 4 cadeias convencionais e fragmentos de ligação antigênica dos mesmos;

[00305] - domínios VHH podem apresentar as chamadas propriedades de ligação de cavidade (entre outros devido a seu loop CDR3 estendido, comparados com convencionais domínios VH) e portanto também podem acessar alvos e epítopes não acessíveis para anticorpos de 4 cadeias convencionais e fragmentos de ligação antigênica dos mesmos.

[00306] Métodos de obtenção de domínios VHH ligando a um antígeno ou um epítope específico foram descritos anteriormente, por exemplo, nas publicações de patente internacional Nos.

WO2006/040153 e WO2006/122786. Conforme também descrito nas mesmas em detalhes, domínios VHH derivados a partir de camelídeos podem ser "humanizados" substituindo um ou mais resíduos aminoácido na sequência de aminoácidos da sequência VHH original por um ou mais dos resíduos aminoácido que ocorrem na posição correspondente ou nas posições correspondentes em um domínio VH de um anticorpo de 4 cadeias convencional de um ser humano. Um domínio VHH humanizado pode conter uma ou mais sequências de regiões de framework totalmente humanas, e, em uma modalidade ainda mais específica, podem conter sequências de regiões de framework humanas derivadas de DP-29, DP-47, DP-51, ou partes das mesmas, opcionalmente combinadas com sequências de JH, tais como JH5.

[00307] f2) "Anticorpos de domínio", também conhecidos como "Dab"s, "*Domain Antibodies*", e "dAbs" (os termos "*Domain Antibodies*" e "dAbs" sendo usados como marcas registradas pelo grupo de empresas da GlaxoSmithKline) foram descritos, por exemplo, em Ward, E.S., *et al.*: "*Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli*"; *Nature* 341: 544-546 (1989); Holt, L.J. *et al.*: "*Domain antibodies: proteins for therapy*"; *TRENDS in Biotechnology* 21(11): 484-490 (2003); e na publicação de patente internacional No. WO2003/002609.

[00308] Anticorpos de domínio essencialmente correspondem aos domínios VH ou VL de mamíferos não camelídeos, em particular anticorpos de 4 cadeias humanas. De modo a ligar um epítotope como um único domínio de ligação de antígeno, isto é, sem ser pareado com um domínio VL ou VH, respectivamente, é necessária seleção específica para semelhantes propriedades de ligação antigênica, por exemplo, usando bibliotecas de sequências de domínios VH ou VL únicos humanos.

[00309] Anticorpos de domínio têm, como VHHs, um peso molecu-

lar de cerca de 13 a cerca de 16 kDa e, caso derivados de sequências totalmente humanas, não necessitam de humanização para, por exemplo, utilização terapêutica em seres humanos. Como no caso de domínios VHH, são bem expressados também em sistemas de expressão procariótica, proporcionando uma redução significativa no custo de fabricação total.

[00310] Anticorpos de domínio, bem como domínios VHH, podem ser submetidos a maturação por afinidade por introdução de uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos de uma ou mais CDRs, cujas alterações resultam em uma aprimorada afinidade do domínio variável único de imunoglobulina resultante por seu respectivo antígeno, em comparação com a molécula parental respectiva. Moléculas de domínios variáveis únicos de imunoglobulina maturados por afinidade da invenção podem ser preparadas por meio de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, conforme descrito por Marks *et al.*, 1992, *Biotechnology* 10:779-783, ou Barbas, *et al.*, 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813.; Shier *et al.*, 1995, *Gene* 169:147-155; Yelton *et al.*, 1995, *Immunol.* 155: 1994-2004; Jackson *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9; e Hawkins *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 226(3): 889 896; KS Johnson e RE Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996.

[00311] f3) Além disso, também será evidente para a pessoa versada que é possível "enxertar" uma ou mais das CDR's mencionadas acima sobre outros "andaimes", inclusive mas não limitados a andaimes humanos ou andaimes não imunoglobulina. Andaimes e técnicas adequados para a enxertiação de CDR referida são conhecidos na técnica.

[00312] g) Os termos "*epítoto*" e "*determinante antigênico*", os quais podem ser usados de modo intercambiável, se referem à parte de uma macromolécula, tal como um polipeptídeo, que é reconhecida

por moléculas de ligação antigênica, tais como anticorpos convencionais ou os polipeptídeos da invenção, e mais particularmente pelo sítio de ligação antigênica das referidas moléculas. Epítopes definem o sítio de ligação mínimo para uma imunoglobulina, e portanto representam o alvo de especificidade de uma imunoglobulina.

[00313] A parte de uma molécula de ligação antigênica (tal como um anticorpo convencional ou um polipeptídeo da invenção) que reconhece o epítope é denominada um *parátope*.

[00314] h) O termo molécula de ligação (antigênica) "*biparatópico*" ou polipeptídeo "*biparatópico*" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, vai significar um polipeptídeo compreendendo um primeiro domínio variável único de imunoglobulina e um segundo domínio variável único de imunoglobulina conforme definido aqui, neste requerimento de patente, em que estes dois domínios variáveis são capazes de ligação a dois diferentes epítopes de um antígeno, cujos epítopes não são normalmente ligados ao mesmo tempo por uma imunoglobulina monoespecífica, tal como por exemplo, um anticorpo convencional ou um domínio variável único de imunoglobulina. Polipeptídeos biparatópicos podem ser compostos de domínios variáveis os quais têm especificidades de epítopes diferentes, e não contêm pares de domínios variáveis mutuamente complementares os quais ligam ao mesmo epítope. Os dois domínios variáveis portanto não competem um com o outro por ligação ao alvo.

[00315] i) Um polipeptídeo ( tal como uma imunoglobulina, um anticorpo, um domínio variável único de imunoglobulina, um polipeptídeo da invenção, ou geralmente uma molécula de ligação antigênica ou um fragmento da mesma) que pode "*ligar a*" ou "*ligar especificamente a*", que "*tem afinidade por*" e/ou que "*tem especificidade por*" um determinado epítope, um determinado antígeno ou uma determinada proteína (ou por no mínimo uma parte, um fragmento ou um epítope da mesma)

diz-se que é "*contra*" ou "*direcionado contra*" o referido epítotope, o referido antígeno ou a referida proteína ou é uma molécula de "*ligação*" com respeito a semelhante epítotope, antígeno ou proteína, ou diz-se que é "anti"-epítotope, "anti"-antígeno ou "anti"-proteína (por exemplo, anti-CX3CR1).

[00316] k) Geralmente, o termo "*especificidade*" se refere ao número de diferentes tipos de antígenos ou epítotospes aos quais uma molécula de ligação antigênica em particular ou uma proteína de ligação antigênica (tal como uma imunoglobulina, um anticorpo, um domínio variável único de imunoglobulina, ou um polipeptídeo da invenção) pode ligar. A especificidade de uma proteína de ligação antigênica pode ser determinada com base em sua afinidade e/ou avidéz. A afinidade, representada pela constante de equilíbrio para a dissociação de um antígeno com uma proteína de ligação antigênica (KD), é uma medida para a força de ligação entre um epítotope e um sítio de ligação antigênica sobre a proteína de ligação antigênica: quanto menor o valor da KD, maior a força de ligação entre um epítotope e a molécula de ligação antigênica (alternativamente, a afinidade também pode ser expressa como a constante de afinidade (KA), a qual é de 1/KD). Conforme será evidente para a pessoa versada (por exemplo, com base na descrição adicional aqui, neste requerimento de patente), a afinidade pode ser determinada em uma maneira conhecida *per se*, dependendo do antígeno específico de interesse. Avidéz é a medida da força de ligação entre uma molécula de ligação antigênica (tal como uma imunoglobulina, um anticorpo, um domínio variável único de imunoglobulina, ou um polipeptídeo da invenção) e o antígeno pertinente. A avidéz é relacionada tanto com a afinidade entre um epítotope e seu sítio de ligação antigênica sobre a molécula de ligação antigênica quanto com o número de sítios de ligação pertinentes presentes sobre a molécula de ligação antigênica.

[00317] l) Resíduos aminoácido sedrão indicados de acordo com o

código de aminoácidos padrão de três letras ou de uma letra, conforme é de conhecimento geral e acordado na técnica. Ao comparar duas sequências de aminoácidos, o termo "*diferença de aminoácidos*" se refere a inserções, deleções ou substituições do número indicado de resíduos aminoácido em uma posição da sequência de referência, comparada com uma segunda sequência. No caso de uma ou mais substituições, a uma ou mais substituições referidas preferencialmente serão uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras, o que significa que um resíduo aminoácido é substituído com outro resíduo aminoácido de estrutura química similar e o qual tem pouca ou essencialmente nenhuma influência sobre a função, a atividade ou outras propriedades biológicas do polipeptídeo. As substituições de aminoácidos conservadoras referidas são de conhecimento geral na técnica, por exemplo, na publicação de patente internacional No. WO 98/49185, em que substituições de aminoácidos conservadoras preferencialmente são substituições nas quais um aminoácido dentro dos grupos (i) a (v) que se seguem é substituído por outro resíduo aminoácido dentro do mesmo grupo: (i) resíduos pequenos alifáticos, não polares ou ligeiramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro e Gly; (ii) resíduos polares, negativamente carregados e suas amidas (não carregadas): Asp, Asn, Glu e Gln; (iii) resíduos polares, positivamente carregados: His, Arg e Lys; (iv) grandes resíduos alifáticos, não polares: Met, Leu, Ile, Val e Cys; e (v) resíduos aromáticos: Phe, Tyr e Trp. Substituições de aminoácidos conservadoras particularmente preferenciais são como se segue:

[00318] Ala para Gly ou para Ser;

[00319] Arg para Lys;

[00320] Asn para Gln ou para His;

[00321] Asp para Glu;

[00322] Cys para Ser;

- [00323] Gln para Asn;
- [00324] Glu para Asp;
- [00325] Gly para Ala ou para Pro;
- [00326] His para Asn ou para Gln;
- [00327] Ile para Leu ou para Val;
- [00328] Leu para Ile ou para Val;
- [00329] Lys para Arg, para Gln ou para Glu;
- [00330] Met para Leu, para Tyr ou para Ile;
- [00331] Phe para Met, para Leu ou para Tyr;
- [00332] Ser para Thr;
- [00333] Thr para Ser;
- [00334] Trp para Tyr;
- [00335] Tyr para Trp ou para Phe;
- [00336] Val para Ile ou para Leu.
- [00337] m) Uma molécula de polipeptídeo ou ácido nucléico é considerada como sendo "*(em forma) essencialmente isolada*" - por exemplo, quando comparada com sua fonte biológica nativa e/ou o meio de reação ou o meio de cultura a partir do qual tenha sido obtida - quando tenha sido separada a partir de no mínimo um outro componente com o qual é geralmente associada na referida fonte ou no referido meio, tal como outro ácido nucléico, outra proteína/outro polipeptídeo, outro componente biológico ou macromolécula ou no mínimo um contaminante, uma impureza ou um componente menor. Em particular, uma molécula de polipeptídeo ou ácido nucléico é considerada "essencialmente isolada" quando foi purificada no mínimo 2 vezes, em particular no mínimo 10 vezes, mais em particular no mínimo 100 vezes, e até 1000 vezes ou mais. Uma molécula de polipeptídeo ou ácido nucléico que está "em forma essencialmente isolada" é preferencialmente essencialmente homogênea, conforme determinado usando uma técnica adequada, tal como uma técnica cromatográfica adequa-

da, tal como eletroforese por gel de poliacrilamida;

[00338] n) "*Identidade de sequências*" entre por exemplo, duas sequências de domínios variáveis únicos de imunoglobulina indica a percentagem de aminoácidos que são idênticos entre estas duas sequências. Pode ser calculada ou determinada conforme descrito no parágrafo f) às páginas 49 e 50 do Requerimento de Patente Internacional de No. WO08/020079. "*Similaridade de sequências*" indica a percentagem de aminoácidos que ou são idênticos ou que representam substituições de aminoácidos conservadoras.

#### **Especificidade de alvo**

[00339] Os polipeptídeos da invenção têm especificidade para CX3CR1 humana. Deste modo, os polipeptídeos da invenção preferencialmente ligam à CX3CR1 humana (SEQ ID NO: 255). Em um aspecto, os polipeptídeos da presente invenção também ligam à CX3CR1 de cynomolgus (SEQ ID NO: 256).

#### **Polipeptídeos da invenção**

[00340] A invenção proporciona novos agentes farmacologicamente ativos para a prevenção, o tratamento, a mitigação e/ou o diagnóstico de doenças, distúrbios ou condições associados com CX3CR1, tais como doenças cardiovasculares. Em particular, a invenção proporciona polipeptídeos os quais ligam a CX3CR1 humana e são capazes de bloquear a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana. Em um aspecto, o polipeptídeo é uma imunoglobulina a qual compreende um domínio de ligação antigênica o qual compreende três regiões determinantes de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3, em que a referida imunoglobulina liga à CX3CR1 humana e é capaz de bloquear a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana. Em um aspecto adicional, o polipeptídeo compreende um ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1, em que o referido polipeptídeo é capaz de bloquear a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana.

[00341] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção é caracterizado por uma ou mais das seguintes propriedades:

- Liga com alta afinidade à CX3CR1 humana, por exemplo, a uma EC50 de menos de ou igual a 10 nM, menos de ou igual a 5 nM, menos de ou igual a 2,5 nM ou menos de ou igual a 1 nM, conforme determinado por FACS de ligação celular;

- Bloqueia a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana, por exemplo, a uma IC50 de menos de ou igual a 300 nM, ou menos de ou igual a 100 nM, ou menos de ou igual a 20 nM, ou menos de ou igual a 10 nM, ou menos de ou igual a 5 nM, ou menos de ou igual a 2,5 nM ou menos de ou igual a 1 nM;

- Inibe a quimiotaxia induzida pela fractalcina mediada pela CX3CR1 humana, por exemplo, a uma IC50 de menos de ou igual a 500 nM, ou menos de ou igual a 100 nM, ou de menos de ou igual a 75 nM, ou menos de ou igual a 50 nM, ou menos de ou igual a 10 nM ou menos de ou igual a 5 nM; a eficácia de inibição obtida é de mais de ou igual a 15%, ou de mais de ou igual a 50%, ou de mais de ou igual a 80%, ou de mais de ou igual a 95%;

- Inibe a internalização induzida pela fractalcina mediada pela CX3CR1 humana, por exemplo, a uma IC50 de menos de ou igual a 10 nM ou menos de ou igual a 5 nM;

- Tem reação cruzada com CX3CR1 de cynomolgus, por exemplo, dentro de 10 vezes da E/IC<sub>50</sub> para CX3CR1 humana para ligação e inibição funcional.

[00341] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção compreende adicionalmente uma porção de prolongamento da meia-vida, por exemplo, uma porção de ligação de albumina, uma molécula de polietileno glicol ou um domínio de Fc. Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção compreende dois ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1. Em um

aspecto, os dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 são encadeados de modo covalente por um peptídeo encadeador. Em um aspecto, os dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 em um polipeptídeo da presente invenção têm a mesma sequência de aminoácidos. Em outro aspecto, os dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 em um polipeptídeo da presente invenção têm sequências de aminoácidos diferentes. Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção compreende dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 e compreende adicionalmente uma porção de prolongamento da meia-vida, por exemplo, uma porção de ligação de albumina, uma molécula de polietileno glicol ou um domínio de Fc.

[00342] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção compreende um primeiro domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 ligado de modo covalente a uma porção de ligação de albumina por um primeiro peptídeo encadeador, em que a referida porção de ligação de albumina é adicionalmente ligada de modo covalente a um segundo domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 por um segundo peptídeo encadeador.

[00343] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção compreende um domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 ligado de modo covalente a um domínio de Fc por um peptídeo encadeador. Em um aspecto, semelhante polipeptídeo compreendendo um domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 ligado de modo covalente a um domínio de Fc por um peptídeo encadeador é proporcionado como um dímero, por exemplo, através de pontes de dissulfeto.

[00344] Polipeptídeos de acordo com a presente invenção são obtidos conforme descrito nas partes que se seguem. Em resumo, domínios variáveis únicos da presente invenção foram identificados a partir

de uma biblioteca expressando domínios variáveis únicos (VHH) derivados a partir de um lhama imunizado com DNA codificando CX3CR1 humana. A biblioteca de fagos foi varrida (*panned*) sobre lipopartículas virais de hCX3CR1 e fagos de ligação foram triados para sua capacidade para competir por ligação de receptor com fractalcina com etiqueta de Alexa-fluor (AF-FKN). Domínios variáveis únicos típicos da presente invenção são descritos aqui, neste requerimento de patente, em detalhes adicionais.

[00345] Em um aspecto, um domínio variável único de imunoglobulina da presente invenção consiste essencialmente em quatro regiões de framework (FR1, FR2, FR3 e FR4) e três regiões determinantes de complementaridade (CDR1, CDR2 e CDR3). Em particular, o domínio variável único de imunoglobulina tem a estrutura FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Em um aspecto, o domínio variável único de imunoglobulina é um domínio de anticorpo.

[00346] Em um aspecto, a CDR3 de um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção tem a sequência de aminoácidos de Asp-Xaa1-Arg-Arg-Gly-Trp-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5 conforme estipulado em SEQ ID NO: 197, em que:

[00347] - Xaa1 é Pro, Ala ou Gly;

[00348] - Xaa2 é Asp ou Asn;

[00349] - Xaa3 é Thr ou Ser;

[00350] - Xaa4 é Arg, Lys, Ala ou Gly; e

[00351] - Xaa5 é Tyr ou Phe.

[00352] Em um aspecto, a CDR3 de um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem a sequência de aminoácidos de Asp-Xaa1-Arg-Arg-Gly-Trp-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5 conforme estipulado em SEQ ID NO: 197, em que:

- [00353] - Xaa1 é Pro, Ala ou Gly;
- [00354] - Xaa2 é Asp ou Asn;
- [00355] - Xaa3 é Thr;
- [00356] - Xaa4 é Arg ou Lys; e
- [00357] - Xaa5 é Tyr.
- [00358] Em um aspecto, a CDR3 de um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem a sequência de aminoácidos de Asp-Pro-Arg-Arg-Gly-Trp-Asp-Thr-Arg-Tyr conforme estipulado em SEQ ID NO: 186.
- [00359] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem as seguintes CDR1, CDR2 e CDR3:
- [00360] - CDR1:
- [00361] a) tem a sequência de aminoácidos de GSIFSSNAMA (SEQ ID NO: 141); ou
- [00362] b) tem uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 80% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 141; ou
- [00363] c) tem uma sequência de aminoácidos que tem 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, em que
- [00364] - na posição 2 o S foi modificado para T, ou G;
- [00365] - na posição 6 o S foi modificado para R;
- [00366] - na posição 7 o N foi modificado para T; e/ou
- [00367] - na posição 9 o M foi modificado para K; ou
- [00368] d) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 141 a 145 e 213;
- [00369] - CDR2:
- [00370] a) tem a sequência de aminoácidos de GINSVGITK (SEQ ID NO: 164); ou

[00371] b) tem uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 70% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 164; ou

[00372] c) tem uma sequência de aminoácidos que tem 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 164, em que

[00373] - na posição 1 o G foi modificado para A, L, V ou S;

[00374] - na posição 3 o N foi modificado para D, S, Q, G ou T;

[00375] - na posição 4 o S foi modificado para T, K, G ou P;

[00376] - na posição 5 o V foi modificado para A;

[00377] - na posição 6 o G foi modificado para D;

[00378] - na posição 7 o I foi modificado para T, ou V;

[00379] - na posição 8 o T foi modificado para A; e/ou

[00380] - na posição 9 o K foi modificado para R; ou

[00381] d) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 162 a 175 e 214 a 221; e

[00382] - CDR3:

[00383] a) tem a sequência de aminoácidos de DPRRGWDTRY (SEQ ID NO: 186); ou

[00384] b) tem uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 70% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 186; ou

[00385] c) tem uma sequência de aminoácidos que tem 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 186, em que

[00386] - na posição 2 o P foi modificado para A, ou G;

[00387] - na posição 7 o D foi modificado para N; e/ou

[00388] - na posição 9 o R foi modificado para K; ou

[00389] d) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 186 a 190.

[00390] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem as seguintes CDR1, CDR2 e CDR3, em que:

[00391] - a referida CDR1 tem a sequência de aminoácidos de GRTFSSYAMG (SEQ ID NO: 146);

[00392] - a referida CDR2 tem uma sequência de aminoácidos que a) tem no mínimo 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de GISGSASRKY (SEQ ID NO: 176) ou b) tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 176 ou 177; e

[00393] - a referida CDR3 tem a sequência de aminoácidos de SNSYPKVQFDY (SEQ ID NO: 191).

[00394] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem as seguintes CDR1, CDR2 e CDR3:

[00395] - a referida CDR1:

[00396] a) tem a sequência de aminoácidos de GTIFSNNAMG (SEQ ID NO: 147); ou

[00397] b) tem uma sequência de aminoácidos que tem 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, em que

[00398] - na posição 1 o G foi modificado para K, R, ou A;

[00399] - na posição 2 o T foi modificado para I, P, S ou L;

[00400] - na posição 3 o I foi modificado para V, ou T;

[00401] - na posição 4 o F foi modificado para L;

[00402] - na posição 5 o S foi modificado para R, ou D;

[00403] - na posição 6 o N foi modificado para S, T, ou D; e/ou

[00404] - na posição 7 o N foi modificado para T, ou Y; ou

[00405] c) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 147 a 161;

[00406] - a referida CDR2:

[00407] a) tem a sequência de aminoácidos de SISNSGSTN (SEQ ID NO: 179); ou

[00408] b) tem uma sequência de aminoácidos que tem 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 179, em que

[00409] - na posição 3 o S foi modificado para T, ou G;

[00410] - na posição 4 o N foi modificado para S, ou I;

[00411] - na posição 5 o S foi modificado para T;

[00412] - na posição 6 o G foi modificado para Y; e/ou

[00413] - na posição 8 o T foi modificado para A; ou

[00414] c) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 178 a 185; e

[00415] - a referida CDR3:

[00416] a) tem a sequência de aminoácidos de DARRGWNTAY (SEQ ID NO: 192); ou

[00417] b) tem uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 80% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 192; ou

[00418] c) tem uma sequência de aminoácidos que tem 2, ou 1 diferença de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 192, em que

[00419] - na posição 2 o A foi modificado para G;

[00420] - na posição 8 o T foi modificado para S;

[00421] - na posição 9 o A foi modificado para G; e/ou

[00422] - na posição 10 o Y foi modificado para F; ou

[00423] d) tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 192 a 196.

[00424] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem as seguintes CDR1, CDR2 e CDR3:

- [00425] - SEQ ID No: 141, 162 e 186, respectivamente; ou
- [00426] - SEQ ID No: 141, 163 e 187, respectivamente; ou
- [00427] - SEQ ID No: 141, 164 e 186, respectivamente; ou
- [00428] - SEQ ID No: 141, 166 e 186, respectivamente; ou
- [00429] - SEQ ID No: 141, 167 e 186, respectivamente; ou
- [00430] - SEQ ID No: 141, 167 e 189, respectivamente; ou
- [00431] - SEQ ID No: 141, 168 e 186, respectivamente; ou
- [00432] - SEQ ID No: 141, 168 e 187, respectivamente; ou
- [00433] - SEQ ID No: 141, 169 e 190, respectivamente; ou
- [00434] - SEQ ID No: 141, 170 e 186, respectivamente; ou
- [00435] - SEQ ID No: 141, 171 e 186, respectivamente; ou
- [00436] - SEQ ID No: 141, 174 e 186, respectivamente; ou
- [00437] - SEQ ID No: 141, 175 e 187, respectivamente; ou
- [00438] - SEQ ID No: 142, 165 e 188, respectivamente; ou
- [00439] - SEQ ID No: 142, 173 e 188, respectivamente; ou
- [00440] - SEQ ID No: 143, 164 e 186, respectivamente; ou
- [00441] - SEQ ID No: 144, 172 e 187, respectivamente; ou
- [00442] - SEQ ID No: 145, 172 e 187, respectivamente; ou
- [00443] - SEQ ID No: 141, 214 e 186, respectivamente; ou
- [00444] - SEQ ID No: 141, 215 e 186, respectivamente; ou
- [00445] - SEQ ID No: 141, 216 e 186, respectivamente; ou
- [00446] - SEQ ID No: 141, 217 e 186, respectivamente; ou
- [00447] - SEQ ID No: 141, 218 e 186, respectivamente; ou
- [00448] - SEQ ID No: 141, 219 e 186, respectivamente; ou
- [00449] - SEQ ID No: 141, 220 e 186, respectivamente; ou
- [00450] - SEQ ID No: 213, 221 e 186, respectivamente; ou
- [00451] - SEQ ID No: 213, 214 e 186, respectivamente.
- [00452] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem as seguintes CDR1, CDR2 e CDR3:

- [00453] - SEQ ID No: 146, 176 e 191, respectivamente; ou
- [00454] - SEQ ID No: 146, 177 e 191, respectivamente.
- [00455] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem as seguintes CDR1, CDR2 e CDR3:
- [00456] - SEQ ID No: 147, 178 e 192, respectivamente; ou
- [00457] - SEQ ID No: 147, 179 e 192, respectivamente; ou
- [00458] - SEQ ID No: 147, 179 e 194, respectivamente; ou
- [00459] - SEQ ID No: 148, 179 e 193, respectivamente; ou
- [00460] - SEQ ID No: 149, 179 e 192, respectivamente; ou
- [00461] - SEQ ID No: 149, 180 e 192, respectivamente; ou
- [00462] - SEQ ID No: 149, 181 e 192, respectivamente; ou
- [00463] - SEQ ID No: 149, 183 e 192, respectivamente; ou
- [00464] - SEQ ID No: 149, 185 e 192, respectivamente; ou
- [00465] - SEQ ID No: 150, 179 e 194, respectivamente; ou
- [00466] - SEQ ID No: 150, 182 e 194, respectivamente; ou
- [00467] - SEQ ID No: 151, 179 e 193, respectivamente; ou
- [00468] - SEQ ID No: 151, 182 e 194, respectivamente; ou
- [00469] - SEQ ID No: 151, 184 e 196, respectivamente; ou
- [00470] - SEQ ID No: 152, 179 e 195, respectivamente; ou
- [00471] - SEQ ID No: 153, 179 e 194, respectivamente; ou
- [00472] - SEQ ID No: 154, 182 e 194, respectivamente; ou
- [00473] - SEQ ID No: 155, 179 e 195, respectivamente; ou
- [00474] - SEQ ID No: 156, 181 e 192, respectivamente; ou
- [00475] - SEQ ID No: 157, 179 e 194, respectivamente; ou
- [00476] - SEQ ID No: 158, 179 e 192, respectivamente; ou
- [00477] - SEQ ID No: 159, 178 e 192, respectivamente; ou
- [00478] - SEQ ID No: 160, 179 e 194, respectivamente; ou
- [00479] - SEQ ID No: 161, 179 e 194, respectivamente.
- [00480] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente in-

venção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem a CDR1, a CDR2 e a CDR3 estipuladas em:

[00481] - SEQ ID NO's: 141, 164 e 186; ou

[00482] - SEQ ID NO's: 141, 162 e 186.

[00483] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção, em particular um domínio único de imunoglobulina da presente invenção, tem a CDR1, a CDR2 e a CDR3 estipuladas em:

[00484] - SEQ ID NO's: 213, 214 e 186; ou

[00485] - SEQ ID NO's: 213, 221 e 186; ou

[00486] - SEQ ID NO's: 141, 162 e 186.

[00487] Polipeptídeos típicos da presente invenção tendo as CDRs descritas acima são mostrados nas Tabelas 1, 2, 3 (polipeptídeos típicos das famílias 101, 9 e 13, respectivamente) e 4 (polipeptídeos típicos de variantes otimizadas da família 101.

**TABELA 1: FAMÍLIA 101**

Nanobody	SEQ	CDR1*	SEQ CDR1	CDR2*	SEQ CDR2	CDR3*	SEQ CDR3
CX3CR1BIIP MP66B02	1	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP54A12	2	GSIFSS- NAMA	141	VINSVGITK	163	DAR- RGWDTRY	187
CX3CR1BIIP MP54A3	3	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP54A4	4	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP54A5	5	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP54A7	6	GTIFSS- NAMA	142	GINSVDITK	165	DPRRGWNT RY	188
CX3CR1BIIP MP54B1	7	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP54B2	8	GTIFSS- NAMA	142	GINSVDITK	165	DPRRGWNT RY	188
CX3CR1BIIP MP54B3	9	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP54B5	10	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDT RY	186

Nanobody	SEQ	CDR1*	SEQ CDR1	CDR2*	SEQ CDR2	CDR3*	SEQ CDR3
CX3CR1BIIP MP54D5	11	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DGRRGWDT RY	189
CX3CR1BIIP MP54D8	12	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP54F6	13	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP54G3	14	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP54H1	15	GTIFSS- NAMA	142	GINSVDITK	165	DPRRGWNT RY	188
CX3CR1BIIP MP54H4	16	GSIFSS- NAMA	141	VINSVGITK	163	DAR- RGWDTRY	187
CX3CR1BIIP MP61F10	17	GTIFSS- NAMA	142	GINSVDITK	165	DPRRGWNT RY	188
CX3CR1BIIP MP61D1	18	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP61D5	19	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP61E2	20	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP61F11	21	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP61G2	22	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP61G3	23	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP61G4	24	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP61F4	25	GSIFSS- NAMA	141	VINTVGITK	168	DAR- RGWDTRY	187
CX3CR1BIIP MP61A11	26	GSIFSS- NAMA	141	VINSVGITK	163	DAR- RGWDTRY	187
CX3CR1BIIP MP61B2	27	GSIFSS- NAMA	141	VINTVGITK	168	DAR- RGWDTRY	187
CX3CR1BIIP MP61C9	28	GSIFSS- NAMA	141	LIDSAGITK	169	DARRGWNT- KY	190
CX3CR1BIIP MP65H02	29	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP65E11	30	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGIK	170	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP	31	GSIFSS-	143	GINSVGITK	164	DPRRGWDT	186

Nanobody	SEQ	CDR1*	SEQ CDR1	CDR2*	SEQ CDR2	CDR3*	SEQ CDR3
MP65E10		NAKA				RY	
CX3CR1BIIP MP65E05	32	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP65B11	33	GSIFSS- NAMA	141	VINKVGITK	171	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP65B07	34	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP65B09	35	GSIFSR- NAMA	144	SINSVGITK	172	DAR- RGWDTRY	187
CX3CR1BIIP MP65H01	36	GGIFSR- NAMA	145	SINSVGITK	172	DAR- RGWDTRY	187
CX3CR1BIIP MP65G07	37	GTIFSS- NAMA	142	GINSVDITR	173	DPRRGWNT RY	188
CX3CR1BIIP MP66H08	38	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP66H04	39	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP66F02	40	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP66E11	41	GSIFSS- NAMA	141	AINSVGTTK	174	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP66D10	42	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP66D08	43	GSIFSS- NAMA	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP66A04	44	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BIIP MP66D04	45	GTIFSS- NAMA	142	GINSVDITK	165	DPRRGWNT RY	188
CX3CR1BIIP MP66D02	46	GSIFSS- NAMA	141	VINSVGITK	163	DAR- RGWDTRY	187
CX3CR1BIIP MP66D06	47	GSIFSS- NAMA	141	SIDSVGITK	175	DAR- RGWDTRY	187
CX3CR1BIIP MP66G01	48	GSIFSS- NAMA	141	LINSVGITK	167	DGRRGWDT RY	189

[00488] \*As seqüências de CDR foram determinadas de acordo com o Antibody Engineering, vol 2 por Konetermann & Dübel (Eds.), Springer Verlag Heidelberg Berlin, 2010. Os números de seqüências na Tabela (SEQ) se referem às seqüências na listagem de seqüências

do presente requerimento.

**TABELA 2: FAMÍLIA 9**

<b>Nanobody</b>	<b>SEQ</b>	<b>CDR1*</b>	<b>SEQ CDR1</b>	<b>CDR2*</b>	<b>SEQ CDR2</b>	<b>CDR3*</b>	<b>SEQ CDR3</b>
CX3CR1BI IPMP11H1 1	49	GRT- FSSYAMG	146	GISGSAS- RKY	176	SNSYPKV QFDY	191
CX3CR1BI IPMP12B6	50	GRT- FSSYAMG	146	GISGSAS- RKY	176	SNSYPKV QFDY	191
CX3CR1BI IPMP12G9	51	GRT- FSSYAMG	146	GISGSGS- RKY	177	SNSYPKV QFDY	191
CX3CR1BI IPMP15G1 1	52	GRT- FSSYAMG	146	GISGSGS- RKY	177	SNSYPKV QFDY	191

[00489] \*As sequências de CDR foram determinadas de acordo com o Antibody Engineering, vol 2 por Konetermann & Dübel (Eds.), Springer Verlag Heidelberg Berlin, 2010. Os números de sequências na Tabela (SEQ) se referem às sequências na listagem de sequências do presente requerimento.

**TABELA 3: FAMÍLIA 13**

<b>Nanobody</b>	<b>SEQ</b>	<b>CDR1*</b>	<b>SEQ CDR1</b>	<b>CDR2*</b>	<b>SEQ CDR2</b>	<b>CDR3*</b>	<b>SEQ CDR3</b>
CX3CR1BII PMP18E6	53	GTIFSN- NAMG	147	SIS- SSGSTN	178	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP12C2	54	GTIFSN- TAMG	148	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNSGY	193
CX3CR1BII PMP18A10	55	GIIFSN- NAMG	149	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18A2	56	GIIFSN- NAMG	149	SIGSTYST N	180	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18A8	57	RTIFRS- NAMG	150	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP18A9	58	GIIFSN- NAMG	149	SIS- STYSTN	181	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18B7	59	GTIFRS- NAMG	151	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNSGY	193
CX3CR1BII	60	GTIFSN-	147	SIS-	178	DARRGWN-	192

Nanobody	SEQ	CDR1*	SEQ CDR1	CDR2*	SEQ CDR2	CDR3*	SEQ CDR3
PMP18B9		NAMG		SSGSTN		TAY	
CX3CR1BII PMP18C6	61	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18C9	62	GIIFSN- NAMG	149	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18D1	63	GIIFSN- NAMG	149	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18D10	64	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18D12	65	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18F1	66	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18F5	67	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18F6	68	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18F9	69	GTIFRT- NAMG	152	SISNS- GSTN	179	DGRRGWN TGY	195
CX3CR1BII PMP18G5	70	RTIFRS- NAMG	150	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP18H1	71	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18H10	72	KTIFRS- NAMG	153	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP18H7	73	GIIFSN- NAMG	149	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP18H9	74	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP20B3	75	GIIFSN- NAMG	149	SIGSTYST N	180	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP20C12	76	GTIFRS- NAMG	151	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNSGY	193
CX3CR1BII PMP20C3	77	GIIFSN- NAMG	149	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP20C6	78	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP20D8	79	GTT- FRS-	154	SITNS- GSTN	182	DAR- RGWNTGY	194

Nanobody	SEQ	CDR1*	SEQ CDR1	CDR2*	SEQ CDR2	CDR3*	SEQ CDR3
		NAMG					
CX3CR1BII PMP20E11	80	RTIFRS- NAMG	150	SITNS- GSTN	182	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP20E5	81	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP20F3	82	GTIFSN- NAMG	147	SIS- SSGSTN	178	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP20F4	83	ATIFRS- NAMG	155	SISNS- GSTN	179	DGRRGWN TGY	195
CX3CR1BII PMP20F5	84	ATIFRS- NAMG	155	SISNS- GSTN	179	DGRRGWN TGY	195
CX3CR1BII PMP21B6	85	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP24A12	86	GIIFSN- NAMG	149	SISNS- GSAN	183	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP24A6	87	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP24B9	88	GTIFRS- NAMG	151	SISISGSTN	184	DAR- RGWNTGF	196
CX3CR1BII PMP24D3	89	GIIFSN- NAMG	149	SIS- STYSTN	181	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP24F7	90	GLIFSN- NAMG	156	SIS- STYSTN	181	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP28B4	91	ATIFRS- NAMG	155	SISNS- GSTN	179	DGRRGWN TGY	195
CX3CR1BII PMP28F1	92	GIIFSN- NAMG	149	SIGSTYST N	180	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP28F6	93	GIIFSN- NAMG	149	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP28F9	94	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP29A5	95	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP29D5	96	GTIFRS- NAMG	151	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNSGY	193
CX3CR1BII PMP29E3	97	KTIFRS- NAMG	153	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP29E7	98	KTIFRS- NAMG	153	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194

<b>Nanobody</b>	<b>SEQ</b>	<b>CDR1*</b>	<b>SEQ CDR1</b>	<b>CDR2*</b>	<b>SEQ CDR2</b>	<b>CDR3*</b>	<b>SEQ CDR3</b>
CX3CR1BII PMP29G10	99	GTIFRS- NAMG	151	SITNS- GSTN	182	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP29G7	100	GIIFSN- NAMG	149	SIT- NTGSTN	185	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP29H1	101	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP37A8	102	RTIFRS- NAMG	150	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP37B9	103	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP37C12	104	GSIFRS- NAMG	157	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP37C7	105	RTIFSN- NAMG	158	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP37D9	106	GTVFSN NAMG	159	SIS- SSGSTN	178	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP37E12	107	KPIFRS- NAMG	160	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP41B10	108	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP41B11	109	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP41B8	110	GIIFSN- NAMG	149	SIGSTYST N	180	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP41C10	111	RTIFRS- NAMG	150	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP41F9	112	GIIFSN- NAMG	149	SIGSTYST N	180	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP41H10	113	GLTLDDY AMG	161	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP46B5	114	RTIFRS- NAMG	150	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP46D3	115	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP46H5	116	GIIFSN- NAMG	149	SIS- STYSTN	181	DARRGWN- TAY	192
CX3CR1BII PMP48B8	117	KTIFRS- NAMG	153	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194

Nanobody	SEQ	CDR1*	SEQ CDR1	CDR2*	SEQ CDR2	CDR3*	SEQ CDR3
CX3CR1BII PMP48D11	118	RTIFRS- NAMG	150	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP48G8	119	RTIFRS- NAMG	150	SISNS- GSTN	179	DAR- RGWNTGY	194
CX3CR1BII PMP48H9	120	GTIFSN- NAMG	147	SISNS- GSTN	179	DARRGWN- TAY	192

[00490] \*As sequências de CDR foram determinadas de acordo com o Antibody Engineering, vol 2 por Konetermann & Dübel (Eds.), Springer Verlag Heidelberg Berlin, 2010. Os números de sequências na Tabela (SEQ) se referem às sequências na listagem de sequências do presente requerimento.

**TABELA 4: VARIANTES OTIMIZADAS**

Nanobody	SEQ	CDR1	SEQ CDR1	CDR2	SEQ CDR2	CDR3	SEQ CDR3
CX3CR1BII PMP66B02	1	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 043	121	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 045	122	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 047	123	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 048	124	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 049	125	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 050	126	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 061	127	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 056	128	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 057	129	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 060	130	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186

Nanobody	SEQ	CDR1	SEQ CDR1	CDR2	SEQ CDR2	CDR3	SEQ CDR3
CX3CR1BII 065	131	GSIFSS- NAMA	141	AIS- SVGVTK	214	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 067	132	GSIFSS- NAMA	141	AI- QSVGVTK	215	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 068	133	GSIFSS- NAMA	141	AIGSVGVT K	216	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 074	134	GSIFSS- NAMA	141	AITSVGVT K	217	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 118	135	GSIFSS- NAMA	141	AINTVGVT K	218	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 129	136	GSIFSS- NAMA	141	AIN- GVGVTK	219	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 158	137	GSIFSS- NAMA	141	AIN- PVGVTK	220	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 306	138	GSI- FSSTA- MA	213	AIS- SVGVTK	214	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 307	139	GSI- FSSTA- MA	213	AISTVGVT K	221	DPRRGWDT RY	186
CX3CR1BII 308	140	GSIFSS- NAMA	141	AINS- VGVTK	162	DPRRGWDT RY	186

[00491] \*As sequências de CDR foram determinadas de acordo com o Antibody Engineering, vol 2 por Konetermann & Dübel (Eds.), Springer Verlag Heidelberg Berlin, 2010. Os números de sequências na Tabela (SEQ) se referem às sequências na listagem de sequências do presente requerimento.

[00492] Em um aspecto adicional, a presente invenção proporciona polipeptídeos que têm um ou mais domínios VHH.

[00493] Em um aspecto, um domínio VHH da presente invenção compreende ou essencialmente consiste na sequência estipulada em:

[00494] a) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; ou

[00495] b) sequências de aminoácidos que têm no mínimo 90% de identidade de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; ou

[00496] c) sequências de aminoácidos que têm 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ou

[00497] d) uma sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 48, ou SEQ ID NO: 121 a 140, ou SEQ ID NO: 222 a 224.

[00498] Em um aspecto adicional, um domínio VHH da presente invenção compreende ou essencialmente consiste na sequência estipulada em:

[00499] a) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; ou

[00500] b) uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 95% de identidade de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; ou

[00501] c) uma sequência de aminoácidos que tem 5, 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; ou

[00502] d) uma sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 49 a 52.

[00503] Em um aspecto adicional, um domínio VHH da presente invenção compreende ou essencialmente consiste na sequência estipulada em:

[00504] a) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; ou

[00505] b) uma sequência de aminoácidos que tem no mínimo 90% de identidade de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; ou

[00506] c) uma sequência de aminoácidos que tem 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; ou

[00507] d) uma sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 53 a 120.

[00508] Em um aspecto adicional, um domínio VHH da presente

invenção compreende ou essencialmente consiste na sequência de aminoácidos estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO: 121 a 140, ou SEQ ID NO: 222 a 224.

[00509] Em um aspecto adicional, um domínio VHH da presente invenção compreende ou essencialmente consiste na sequência de aminoácidos estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO: 138 a 140.

[00510] Em um aspecto adicional, um domínio VHH da presente invenção compreende ou essencialmente consiste na sequência de aminoácidos estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO: 222 a 224.

[00511] Domínios VHH típicos da presente invenção são mostrados na Tabela 5 e domínios VHH otimizados típicos da presente invenção são mostrados na Tabela 6 abaixo:

**TABELA 5: DOMÍNIOS VHH**

[00512] SEQ ID NO: 1 a 48 são domínios VHH da família 101. SEQ ID NO: 49 a 52 são domínios VHH da família 9. SEQ ID NO: 53 a 120 são domínios VHH da família 13.

CX3CR1BIIP MP66B02	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFS NAMA-WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT KYADSVKGRFTISRDAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	1
CX3CR1BIIP MP54A12	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIF SSNAMA-WYRQAPGKQRDLVAVIN SVGITKYADSVKGRFTISG DNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCT SDARRGWDT-RYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	2
CX3CR1BIIP MP54A3	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIF SSNAMA-WYRQAPGKQRDLVAGIN SVGITKYADSVKGRFTISRDAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	3
CX3CR1BIIP MP54A4	EVQLVESGRGSVQAGESLRLSCAASGSIF SSNAM-AWYRQAPGKQRDLVAGIN SVGITKYADSVKGRFTISRDAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	4
CX3CR1BIIP MP54A5	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIF SS-NAMAWYRQAPGKQRDLVAGIN SVGIT-KYDSVKGRFTISRDAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	5

CX3CR1BIIP MP54A7	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAMA- WYRQAPGKQRDLVAGINSVDITKYADSVKGRFTISR- DNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSD- PRRGWNTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	6
CX3CR1BIIP MP54B1	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA- WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS- RDNKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWD- TRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	7
CX3CR1BIIP MP54B2	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAMA- WYRQAPGKQRDLVAGINSVDITKYADSVKGRFTISR- DNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWN- TRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	8
CX3CR1BIIP MP54B3	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAM- AWYRQAPGKQRDLVAAINSVDITKYADSVKGRFTI- SRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG- WDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	9
CX3CR1BIIP MP54B5	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAM- AWYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTI- SRDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW- DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	10
CX3CR1BIIP MP54D5	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA- WYRQAPPKGQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTI- SSDNAKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCTSDGRR- GWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	11
CX3CR1BIIP MP54D8	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA- WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTISR- DNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDT- RYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	12
CX3CR1BIIP MP54F6	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAM- AWYRQAPGKQRDLVAAINSVDIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWD-TRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	13
CX3CR1BIIP MP54G3	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAM- AWYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS- RDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWD- TRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	14
CX3CR1BIIP MP54H1	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAMA- WYRQAPGKQRDLVAGINSVDITKYADSVKGRFTV- SRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSD- PRRGWNTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	15

CX3CR1BIIP MP54H4	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAVINSVGIT- KYADSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDARRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	16
CX3CR1BIIP MP61F10	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAGINSVDIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWNTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	17
CX3CR1BIIP MP61D1	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAFGKQRDLVALINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	18
CX3CR1BIIP MP61D5	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAFGKQRDLVALINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	19
CX3CR1BIIP MP61E2	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAGINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPED- MAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	20
CX3CR1BIIP MP61F11	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQPPGKQRDLVAAINSVGIT- KYADSVKGRFTIFRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	21
CX3CR1BIIP MP61G2	EVQLVKSGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVALINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	22
CX3CR1BIIP MP61G3	KVQLVESGGGSMQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAAINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMMSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	23
CX3CR1BIIP MP61G4	KVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAAINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMMSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	24
CX3CR1BIIP MP61F4	EVQLVESGGGSVQAGASLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAVINTVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDARRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	25

CX3CR1BIIP MP61A11	EVQLVESRGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRDLVAVINSVGIT- KYADSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDARRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	26
CX3CR1BIIP MP61B2	EVQLVESRGGSVQAGASLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRDLVAVINTVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDARRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	27
CX3CR1BIIP MP61C9	EVQLVKSGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQALGKQRDLVALIDSAGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNRLLKPEDTA- VYYCASDARRGWNTKYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	28
CX3CR1BIIP MP65H02	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRDLVAAINS VGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVHLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	29
CX3CR1BIIP MP65E11	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRDLVAGINS- VGI AKYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLK- PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	30
CX3CR1BIIP MP65E10	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNA- KAWYRQAPGKQRDLVAGINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	31
CX3CR1BIIP MP65E05	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	32
CX3CR1BIIP MP65B11	EVQLVKSGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRDLVAVINKVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	33
CX3CR1BIIP MP65B07	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRDLVAAINS VGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	34
CX3CR1BIIP MP65B09	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSR- NAMA WYRQAPGKQRDLVASINSVGIT- KYGDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDARRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	35

CX3CR1BIIP MP65H01	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGGIFSRNA- MAWYRQAPGKQRDLVASINSVGITKYGDSVKGR- FTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSDA- RRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	36
CX3CR1BIIP MP65G07	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAM- AWYRQAPGKQRDLVAGINSVDITRYADSVKGRFTIS- RDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWN- TRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	37
CX3CR1BIIP MP66H08	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA- WYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS- RDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSD- PRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	38
CX3CR1BIIP MP66H04	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAAINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMMSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	39
CX3CR1BIIP MP66F02	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVALINSVGIT- KYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	40
CX3CR1BIIP MP66E11	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAAINSVGTT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	41
CX3CR1BIIP MP66D10	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQALGKQRDLVALINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	42
CX3CR1BIIP MP66D08	EVQLMESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAGINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	43
CX3CR1BIIP MP66A04	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQALGKQRDLVALINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	44
CX3CR1BIIP MP66D04	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAGINSVDIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWNTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	45

CX3CR1BIIP MP66D02	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAVINSVGIT- KYADSVKGRFTTSGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDARRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	46
CX3CR1BIIP MP66D06	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVASIDSVGIT- KYRDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDARRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	47
CX3CR1BIIP MP66G01	EMQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVALINSVGIT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDGRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	48
CX3CR1BIIP MP11H11	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAM- GWFRQAPGKERAFVAGISGSAS- RKYADSVKGRFTVSRDNARNTVYLQMNSLK- PEDTAVYYCAASNSYPKVQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	49
CX3CR1BIIP MP12B6	EVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAM- GWFRQAPGRERAFVAGISGSAS- RKYADSVKGRFTVSRDNARNTVYLQMNSLK- PEDTAVYYCAASNSYPKVQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	50
CX3CR1BIIP MP12G9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAM- GWFRQAPGKEREFVAGISGSGS- RKYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLKPE- DRAVYYCAASNSYPKVQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	51
CX3CR1BIIP MP15G11	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAM- GWFRQAPGKEREFVAGISGSGS- RKYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLKPE- DRAVYYCAASNSYPKVQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	52
CX3CR1BIIP MP18E6	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAM- GWYRQAPGKKRDLVASIS- SSGSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWGQGAQVTVSS	SEQ ID NO:	53
CX3CR1BIIP MP12C2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNTAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNSGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	54
CX3CR1BIIP MP18A10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSAKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	55
CX3CR1BIIP	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVTSGIIFSNNAM-	SEQ	56

MP18A2	GWYRQGP GK KRD LVASI- GSTYSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNS- LKPEDTGVYYCTIDARRGWNTAYWGQGTPTVTVSS	ID NO:	
CX3CR1BIIP MP18A8	EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCATSRTIFRSNAM- GWYRQAPGK KRD LVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTIDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	57
CX3CR1BIIP MP18A9	EVQLVESGGGVVQP GGS LRLSCVTSGIIFSNNAM- GWYRQGP GK KRD LVASIS- STYSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTIDARRGWNTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO:	58
CX3CR1BIIP MP18B7	EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCATS SGTIFRSNAM- GWYRQAPGK KRD LVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNSGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	59
CX3CR1BIIP MP18B9	EVQLVESRGGLVQP GGS LRLSCATS SGTIFSNNAM- GWYRQAPGK KRD LVASIS- SSGSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	60
CX3CR1BIIP MP18C6	EVQLMESGGGLVQP GGS LRLSCATS SGTIFSNNAM- GWYRQAPGK KRD LVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	61
CX3CR1BIIP MP18C9	EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCATS SGIIFSNNAM- GWYRQAPGK KRD LVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	62
CX3CR1BIIP MP18D1	EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCATS SGIIFSNNAM- GWYRQAPGK KRD LVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKSTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	63
CX3CR1BIIP MP18D10	EVQLVESGGGLVQP GGS LGLSCATS SGTIFSNNAM- GWYRQAPGK KRD LVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	64
CX3CR1BIIP MP18D12	EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCTTSGTIFSNNAM- GWYRQAPGK KRD LVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNNLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	65
CX3CR1BIIP	KVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCATS SGTIFSNNAM-	SEQ	66

MP18F1	GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	ID NO:	
CX3CR1BIIP MP18F5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	67
CX3CR1BIIP MP18F6	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	68
CX3CR1BIIP MP18F9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRTNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTAYLQMNSLK- PEDTGVYYCTIDGRRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	69
CX3CR1BIIP MP18G5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	70
CX3CR1BIIP MP18H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQALGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	71
CX3CR1BIIP MP18H10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSKTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	72
CX3CR1BIIP MP18H7	EVQLVESRGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	73
CX3CR1BIIP MP18H9	EVQLVKSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGTIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNNLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	74
CX3CR1BIIP MP20B3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVTSGIIFSNAM- GWYRQGP GKKRDLVASI- GSTYSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNS- LKPEDTGVYYCTIDARRGWNTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO:	75
CX3CR1BIIP MP20C12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS-	SEQ ID NO:	76

	GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNSGYWGQGTQVTVSS		
CX3CR1BIIP MP20C3	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	77
CX3CR1BIIP MP20C6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	78
CX3CR1BIIP MP20D8	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGTTFRSNAM- GWYRQGP GKKRDLVASITNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMSSLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	79
CX3CR1BIIP MP20E11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAM- GWYRQGP GKKRDLVASITNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	80
CX3CR1BIIP MP20E5	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQVPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	81
CX3CR1BIIP MP20F3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASIS- SSGSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	82
CX3CR1BIIP MP20F4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSATIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTAYLQMNSLK- PEDTGVYYCTIDGRRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	83
CX3CR1BIIP MP20F5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSATIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRS- TVSRDNDKNTAYLQMNSLKPEDTGVYYCTID- GRRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	84
CX3CR1BIIP MP21B6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDMGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	85
CX3CR1BIIP MP24A12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS-	SEQ ID NO:	86

	GSANYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK-PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS		
CX3CR1BIIP MP24A6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGTIFSNAMG-WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTVSGDNDKNTGYLQMNNLKPEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	87
CX3CR1BIIP MP24B9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRSNAM-GWYRQAPGKKRDLVASISISGSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRGWNTGFWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	88
CX3CR1BIIP MP24D3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVTSGIIFSNAM-GWYRQGPQKKRDLVASIS-STYSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK-PEDTGVYYCTIDARRGWNTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO:	89
CX3CR1BIIP MP24F7	EVQLMESGGGMVQVGGSLRLSCTASGLIFSNNAM-GWYRQGPQKKRDLVASIS-STYSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK-PEDTGVYYCTIDARRGWNTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO:	90
CX3CR1BIIP MP28B4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISATIFRSNAM-GWYRQAPGKKRDLVASISNS-GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTAYLQMNSLK-PEDTGVYYCTIDGRRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	91
CX3CR1BIIP MP28F1	EMQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVTSGIIFSNAM-GWYRQGPQKKRDLVASI-GSTYSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGWNTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO:	92
CX3CR1BIIP MP28F6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNAM-GWYRQAPGKKRDLVASISNS-GSTNHADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK-PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	93
CX3CR1BIIP MP28F9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM-GWYRQVPGKKRDLVASISNS-GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK-PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	94
CX3CR1BIIP MP29A5	EVQLVESRGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM-GWYRQAPGKKRDLVASISNS-GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK-PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	95
CX3CR1BIIP MP29D5	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRSNAM-GWYRQAPGKKRDLVASISNS-	SEQ ID NO:	96

	GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNSGYWGQGTQVTVSS		
CX3CR1BIIP MP29E3	EVQLVESEGGLVQPGGSLRLPCATSKTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	97
CX3CR1BIIP MP29E7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSKTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRGLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	98
CX3CR1BIIP MP29G10	EVQLMESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRSNAM- GWYRQGP GKKRDLVASITNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMSSLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	99
CX3CR1BIIP MP29G7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAM- GWYRQGP GKKRDLVASIT- NTGSTNYADSVKGRFTVSRDNDRNTVYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	100
CX3CR1BIIP MP29H1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTTSGTIFSNNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNNLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	101
CX3CR1BIIP MP37A8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSAKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	102
CX3CR1BIIP MP37B9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	103
CX3CR1BIIP MP37C12	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTIDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	104
CX3CR1BIIP MP37C7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFSNNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	105
CX3CR1BIIP MP37D9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTVFSNNAM- GWYRQAPGKKRDLVASIS-	SEQ ID NO:	106

	SSGSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS		
CX3CR1BIIP MP37E12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSKPIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	107
CX3CR1BIIP MP41B10	EVQLVESEGGLVQPGGSLRLSCTTSGTIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNNLK- PEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	108
CX3CR1BIIP MP41B11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSPK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	109
CX3CR1BIIP MP41B8	EVQLVESEGGVVQPGGSLRLSCVTSGIIFSNAM- GWYRQGP GKKRDLVASI- GSTYSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNS- LKPEDTGVYYCTIDARRGWNTAYWGQGTPVTVSS	SEQ ID NO:	110
CX3CR1BIIP MP41C10	EMQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKSTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	111
CX3CR1BIIP MP41F9	EVQLVESGGGVVQPGESLRLSCVTSGIIFSNAM- GWYRQGP GKKRDLVASI- GSTYSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNS- LKPEDTGVYYCTIDARRGWNTAYWGQGTPVTVSS	SEQ ID NO:	112
CX3CR1BIIP MP41H10	KVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCAASGLTLDDYAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTIDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	113
CX3CR1BIIP MP46B5	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTIDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	114
CX3CR1BIIP MP46D3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQVP GKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLRMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	115
CX3CR1BIIP MP46H5	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVTSGIIFSNAM- GWYRQGP GKKRDLVASI- STYSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK-	SEQ ID NO:	116

	PEDTGVYYCTIDARRGWNTAYWGQGTPTVTVSS		
CX3CR1BIIP MP48B8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSKTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYTDSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	117
CX3CR1BIIP MP48D11	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	118
CX3CR1BIIP MP48G8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFA- VSRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDAR- RGWNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	119
CX3CR1BIIP MP48H9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAM- GWYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYAD- FVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNSLK- PEDTGVYYCTVDARRGWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	120

**TABELA 6: DOMÍNIOS VHH OTIMIZADOS**

CX3CR1BI I043	EVQLVESGGGSVQPGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO:	121
CX3CR1BI I045	DVQLVESGGGSVQPGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO:	122
CX3CR1BI I047	EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO:	123
CX3CR1BI I048	EVQLVESGGGSVQPGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO:	124
CX3CR1BI I049	EVQLVESGGGSVQPGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKQRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO:	125
CX3CR1BI I050	EVQLVESGGGSVQPGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKRRELVAAINSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA-	SEQ ID NO:	126

	VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS		
CX3CR1BI I061	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKRRDLVAAINS VGT- KYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	127
CX3CR1BI I056	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRDLVAAINS VGT- KYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	128
CX3CR1BI I057	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKRRELVAAINS VGT- KYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	129
CX3CR1BI I060	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRELVAAINS VGT- KYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	130
CX3CR1BI I065	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKRRDLVAAISS VGT- KYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	131
CX3CR1BI I067	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKRRDLVAAIQS VGT- KYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	132
CX3CR1BI I068	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKRRDLVAAIGS VGT- KYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	133
CX3CR1BI I074	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKRRDLVAAITS VGT- KYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	134
CX3CR1BI I118	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKRRDLVAINTV GVT- KYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	135
CX3CR1BI I129	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKRRDLVAAING VGT- KYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTA-	SEQ ID NO:	136

	VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS		
CX3CR1BI I158	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NMAWYRQAPGKRRDLVAAINPVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	137
CX3CR1BI I306	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTA- MAWYRQAPGKRRDLVAAISSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	138
CX3CR1BI I307	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTA- MAWYRQAPGKRRDLVAAISTVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	139
CX3CR1BI I308	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSS- NMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	140
CX3CR1BI I00306 (D1E)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTA- MAWYRQAPGKRRDLVAAISSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	222
CX3CR1BI I00307 (D1E)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTA- MAWYRQAPGKRRDLVAAISTVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	223
CX3CR1BI I00308 (D1E)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSS- NMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:	224

[00513] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, em particular um domínio variável único de imunoglobulina da presente invenção, é humanizado e/ou otimizado para estabilidade, potência, fabricabilidade e/ou similaridade para regiões de framework humanas. Por exemplo, o polipeptídeo é humanizado e/ou tem otimização de sequência em uma ou mais das seguintes posições (de acordo com numeração Kabat): 1, 11, 14, 16, 74, 83, 108. Em um aspecto, o polipeptídeo compreende uma ou mais das seguintes mutações: E1D, S11L, A14P, E16G, A74S, K83R, Q108L.

[00514] Em um aspecto, uma ou mais regiões de framework de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, em particular um domínio variável único de imunoglobulina da presente invenção, são humanizadas e/ou têm otimização de sequência. Em um aspecto, um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, em particular um domínio variável único de imunoglobulina da presente invenção, compreende regiões de framework (FR) por exemplo, conforme estipulado abaixo:

[00515] i) FR1 é selecionado entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 198 a 204;

[00516] ii) FR2 é selecionado entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 205 a 208;

[00517] iii) FR3 é selecionado entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 209 a 210; e/ou

[00518] iv) FR4 é selecionado entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 211 a 212.

[00519] Sequências de regiões de framework (FR) de imunoglobulina humana que também podem ser usadas como sequências de regiões de framework para os domínios variáveis únicos de imunoglobulina conforme descrito acima são conhecidas na técnica. Além disso são conhecidos na técnica métodos para humanização de regiões de framework de domínios variáveis únicos de imunoglobulina derivada a partir de espécies diferentes de humanos.

[00520] Em um aspecto adicional, uma ou mais regiões de CDR de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, em particular um domínio variável único de imunoglobulina da presente invenção, são humanizadas e/ou têm otimização de sequência. Em um aspecto, um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, em particular um domínio variável único de imunoglobulina da presente invenção, é humanizado e/ou tem otimização de sequência em uma ou mais das seguintes posições (de acordo com numeração Kabat): 52, 53.

[00521] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, em particular um domínio variável único de imunoglobulina da presente invenção, compreende uma ou mais das seguintes mutações: N52S, S53T.

[00522] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, em particular um domínio variável único de imunoglobulina da presente invenção, compreende uma CDR2 selecionada entre qualquer uma de SEQ ID NO's: 214 a 221.

[00523] Sequências típicas humanizadas e/ou otimizadas da presente invenção são mostradas na Tabela 4 e 6 nas partes que se seguem e na Tabela 7 abaixo aqui, neste requerimento de patente.

#### **TABELA 7: VARIANTES DE SEQUÊNCIA OTIMIZADA**

[00524] A Tabela 7a mostra a FR1-CDR1-FR2-CDR2 das variantes de sequência otimizada, a Tabela 7b mostra a FR3-CDR3-FR4-CDR4 das referidas variantes. Os números de sequências nas tabelas (SEQ) se referem às sequências na listagem de sequências do presente requerimento.

#### **Tabela 7a: Variantes de sequência otimizada (FR1-CDR1-FR2-CDR2)**

Nano body	SEQ	FR1	SEQ FR1	CDR1	SEQ CDR1	FR2	SEQ FR2	CDR2	SEQ CDR2
CX3CR1 BII066 B02	1	EVQLVES-GGGSVQA GESLRLS-CAAS	198	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII043	121	EVQLVES-GGGSVQP GESLRLS-CAAS	199	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII045	122	DVQLVES-GGGSVQP GESLRLS-CAAS	200	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII047	123	EVQLVES-GGGLVQP GESLRLS-CAAS	201	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AINS-VGVT K	162

Nano body	SEQ	FR1	SEQ FR1	CDR1	SEQ CDR1	FR2	SEQ FR2	CDR2	SEQ CDR2
CX3CR1 BII048	124	EVQLVES-GGGSVQP GGSLRLS-CAAS	202	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII049	125	EVQLVES-GGGSVQP GESLRLS-CAAS	199	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK QRDLVA	206	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII050	126	EVQLVES-GGGSVQP GESLRLS-CAAS	199	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRELVA	207	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII061	127	EVQLVES-GGGLVQP GGSLRLS-CAAS	203	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII056	128	EVQLVES-GGGLVQP GGSLRLS-CAAS	203	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK QRDLVA	206	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII057	129	EVQLVES-GGGLVQP GGSLRLS-CAAS	203	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRELVA	207	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII060	130	EVQLVES-GGGLVQP GGSLRLS-CAAS	203	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK QRELVA	208	AINS-VGVT K	162
CX3CR1 BII065	131	EVQLVES-GGGSVQA GESLRLS-CAAS	198	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AIS-SVGV TK	214
CX3CR1 BII067	132	EVQLVES-GGGSVQA GESLRLS-CAAS	198	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AI-QSVG VTK	215
CX3CR1 BII068	133	EVQLVES-GGGSVQA GESLRLS-CAAS	198	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AIGSV GVTK	216
CX3CR1 BII074	134	EVQLVES-GGGSVQA GESLRLS-CAAS	198	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AITSV GVTK	217
CX3CR1 BII118	135	EVQLVES-GGGSVQA GESLRLS-CAAS	198	GSI-FSS-NAMA	141	WYR-QAPGK RRDLVA	205	AINTV GVTK	218
CX3CR1	136	EVQLVES-	198	GSI-	141	WYR-	205	AIN-	219

Nano body	SEQ	FR1	SEQ FR1	CDR1	SEQ CDR1	FR2	SEQ FR2	CDR2	SEQ CDR2
BII129		GGGSVQA GESLRLS- CAAS		FSS- NAMA		QAPGK RRDLVA		GVGV TK	
CX3CR1 BII158	137	EVQLVES- GGGSVQA GESLRLS- CAAS	198	GSI- FSS- NAMA	141	WYR- QAPGK RRDLVA	205	AIN- PVG TK	220
CX3CR1 BII306	138	DVQLVES- GGGLVQP GGSLRLS- CAAS	204	GSI- FSSTA MA	213	WYR- QAPGK RRDLVA	205	AIS- SVG TK	214
CX3CR1 BII307	139	DVQLVES- GGGLVQP GGSLRLS- CAAS	204	GSI- FSSTA MA	213	WYR- QAPGK RRDLVA	205	AISTV GVTK	221
CX3CR1 BII308	140	DVQLVES- GGGLVQP GGSLRLS- CAAS	204	GSI- FSS- NAMA	141	WYR- QAPGK RRDLVA	205	AINS- VGV TK	162

**Tabela 7b: Variantes de sequência otimizada (FR3-CDR3-FR4)**

Nano body	SEQ	FR3	SEQ FR3	CDR3	SEQ CDR3	FR4	SEQ FR4
CX3CR1B IIPMP66B 02	1	YADSVKGRFTISRD- NAKNTVYLQMNS- LKPEDTAVYYCTS	209	DPRRGWDTR Y	186	WGQGT- QVTVSS	211
CX3CR1B II043	121	YADSVKGRFTIS- RDNSKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTR Y	186	WGQG- TLVTVSS	212
CX3CR1B II045	122	YADSVKGRFTIS- RDNSKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTR Y	186	WGQG- TLVTVSS	212
CX3CR1B II047	123	YADSVKGRFTIS- RDNSKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTR Y	186	WGQG- TLVTVSS	212
CX3CR1B II048	124	YADSVKGRFTIS- RDNSKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTR Y	186	WGQG- TLVTVSS	212
CX3CR1B II049	125	YADSVKGRFTIS- RDNSKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTR Y	186	WGQG- TLVTVSS	212
CX3CR1B II050	126	YADSVKGRFTIS- RDNSKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTR Y	186	WGQG- TLVTVSS	212
CX3CR1B II061	127	YADSVKGRFTIS- RDNSKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTR Y	186	WGQG- TLVTVSS	212

Nano body	SEQ	FR3	SEQ FR3	CDR3	SEQ CDR3	FR4	SEQ FR4
CX3CR1B II056	128	YADSVKGRFTIS-RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II057	129	YADSVKGRFTIS-RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II060	130	YADSVKGRFTIS-RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II065	131	YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS-LKPEDTAVYYCTS	209	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II067	132	YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS-LKPEDTAVYYCTS	209	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II068	133	YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS-LKPEDTAVYYCTS	209	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II074	134	YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS-LKPEDTAVYYCTS	209	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II118	135	YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS-LKPEDTAVYYCTS	209	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II129	136	YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS-LKPEDTAVYYCTS	209	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II158	137	YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS-LKPEDTAVYYCTS	209	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II306	138	YADSVKGRFTIS-RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II307	139	YADSVKGRFTIS-RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212
CX3CR1B II308	140	YADSVKGRFTIS-RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTS	210	DPRRGWDTRY	186	WGQG-TLVTVSS	212

[00525] Em um aspecto da presente invenção, um polipeptídeo da invenção pode conter adicionalmente modificações tais como resíduos glicosila, cadeias laterais de aminoácidos modificados, e semelhantes.

[00526] Será evidente para a pessoa versada que para utilizações farmacêuticas em seres humanos, os polipeptídeos da invenção são

preferencialmente direcionados contra CX3CR1 humana, ao passo que para fins de veterinária, os polipeptídeos da invenção são preferencialmente direcionados contra a CX3CR1 da espécie a ser tratada.

[00527] Além disso será evidente para a pessoa versada que quando usados como um agente terapêutico em seres humanos, os domínios variáveis únicos de imunoglobulina compreendidos nos polipeptídeos de acordo com a invenção são preferencialmente domínios variáveis únicos de imunoglobulina humanizados.

[00528] De acordo com a invenção, um domínio variável único de imunoglobulina pode ser um anticorpo de domínio, isto é, anticorpo de VL ou VH, e/ou domínios VHH conforme descrito acima, e/ou qualquer outro tipo de domínio variável único de imunoglobulina, por exemplo, VH camelizado, contanto que estes domínios variáveis únicos de imunoglobulina sejam domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1.

[00529] Em um aspecto da invenção, o domínio variável único de imunoglobulina essencialmente consiste em ou uma sequência de anticorpo de domínio ou uma sequência de domínio VHH conforme descrito acima. Em particular, o domínio variável único de imunoglobulina essencialmente consiste em uma sequência de domínio VHH.

[00530] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção compreende dois ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1. Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção compreende dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1, por exemplo, VHHs anti-CX3CR1. Em um aspecto, os dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 em um polipeptídeo da presente invenção têm a mesma sequência de aminoácidos. Em outro aspecto, os dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 em um polipeptídeo da presente invenção têm sequências de aminoácidos diferentes.

[00531] De acordo com outra modalidade da invenção, os no mínimo dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina presentes em um polipeptídeo da invenção podem ser ligados uns aos outros diretamente (isto é, sem uso de um encadeador) ou através de um encadeador. O encadeador é preferencialmente um peptídeo encadeador e, de acordo com a invenção, será selecionado de modo a permitir a ligação dos no mínimo dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina a CX3CR1, quer dentro de uma e da mesma molécula de CX3CR1, ou dentro de duas moléculas diferentes.

[00532] Encadeadores adequados entre outros vão dependes dos epítopes e, especificamente, da distância entre os epítopes sobre a CX3CR1 à qual os domínios variáveis únicos de imunoglobulina ligam, e serão evidentes para a pessoa versada com base na descrição aqui, neste requerimento de patente, opcionalmente depois de algum grau limitado de experimentação de rotina.

[00533] Além disso, quando os dois ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 são anticorpos de domínio ou domínios VHH, também podem ser ligados uns aos outros através de um terceiro anticorpo de domínio ou domínio VHH (no qual os dois ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina podem ser ligados diretamente ao terceiro anticorpo de domínio ou domínio VHH ou através de encadeadores adequados). Um terceiro anticorpo de domínio ou domínio VHH semelhante pode ser, por exemplo, um anticorpo de domínio ou um domínio VHH que proporciona uma meia-vida aumentada, conforme adicionalmente descrito aqui, neste requerimento de patente. Por exemplo, o último anticorpo de domínio ou domínio VHH pode ser um anticorpo de domínio ou um domínio VHH que é capaz de ligação a uma proteína do soro (humana) tal como albumina sérica (humana) ou transferrina (humana), conforme adicionalmente descrito aqui, neste requerimento de patente.

[00534] Alternativamente, os dois ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 podem ser ligados em série (quer diretamente ou através de um encadeador adequado) e o terceiro (único) anticorpo de domínio ou domínio VHH (o qual pode proporcionar meia-vida aumentada, conforme descrito acima) pode ser conectado diretamente ou através de um encadeador a uma destas duas ou mais sequências de imunoglobulina mencionadas acima.

[00535] Encadeadores adequados são descritos aqui, neste requerimento de patente, em conexão com específico polipeptídeos da invenção e podem compreender - por exemplo, e sem limitação - uma sequência de aminoácidos, cuja sequência de aminoácidos preferencialmente tem uma extensão de 5 ou mais aminoácidos, 7 ou mais aminoácidos, 9 ou mais aminoácidos, 11 ou mais aminoácidos, 15 ou mais aminoácidos ou no mínimo 17 aminoácidos, tal como cerca de 20 a 40 aminoácidos. No entanto, o limite superior não é crucial mas é escolhido por razões de conveniência considerando, por exemplo, a produção biofarmacêutica de semelhantes polipeptídeos.

[00536] A sequência de encadeador pode ser uma sequência que ocorre naturalmente ou uma sequência que não ocorre naturalmente. Caso usada para fins terapêuticos, o encadeador é preferencialmente não imunogênico no indivíduo ao qual o polipeptídeo da invenção é administrado.

[00537] Um grupo útil de sequências de encadeadores são encadeadores derivados a partir da região de articulação de anticorpos de cadeia pesada conforme descrito nas publicações de patente internacional Nos. WO 96/34103 e WO 94/04678.

[00538] Outros exemplos são sequências de encadeadores de poli-alanina tais como Ala-Ala-Ala.

[00539] Exemplos preferenciais adicionais de sequências de encadeadores são encadeadores de Gly/Ser de diferente extensão tais co-

mo encadeadores de  $(\text{gly}_x\text{ser}_y)_z$ , incluindo  $(\text{gly}_4\text{ser})_3$ ,  $(\text{gly}_4\text{ser})_4$ ,  $(\text{gly}_4\text{ser})$ ,  $(\text{gly}_3\text{ser})$ ,  $\text{gly}_3$ , e  $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_3$ .

[00540] Se o polipeptídeo da invenção for modificado pela ligação de um polímero, por exemplo, uma porção polietileno glicol (PEG), a sequência de encadeador preferencialmente inclui um resíduo aminoácido, tal como uma cisteína ou uma lisina, permitindo a referida modificação, por exemplo, PEGuilação, na região do encadeador.

EXEMPLOS DE ENCADEADORES SÃO:

- [00541] GGGGS (encadeador de 5 GS, SEQ ID NO: 233)
- [00542] SGGSGGS (encadeador de 7GS, SEQ ID NO: 234)
- [00543] GGGGCGGS (encadeador de 8GS, SEQ ID NO: 235)
- [00544] GGGGSGGS (encadeador de 9GS, SEQ ID NO: 236)
- [00545] GGGGSGGGGS (encadeador de 10GS, SEQ ID NO: 237)
- [00546] GGGGSGGGGSGGGGS (encadeador de 15GS, SEQ ID NO: 238)
- [00547] GGGGSGGGGSGGGGGGS (encadeador de 18GS, SEQ ID NO: 239)
- [00548] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (encadeador de 20GS, SEQ ID NO: 240)
- [00549] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (encadeador de 25GS, SEQ ID NO: 241)
- [00550] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (encadeador de 30GS, SEQ ID NO: 242)
- [00551] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (encadeador de 35GS, SEQ ID NO: 243)
- [00552] EPKSCDKTHTCPPCP (encadeador de articulação de G1, SEQ ID NO: 244)
- [00553] GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP (encadeador de 9GS-articulação de G1, SEQ ID NO: 245)
- [00554] EPKTPKPQAAA (região de articulação longa superior de

Lhama, SEQ ID NO: 246)

[00555] ELKTPL-

GDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSC  
DTPPPCPRCP (articulação de G3, SEQ ID NO: 247)

[00556] AAA (encadeador de Ala, SEQ ID NO: 248)

[00557] Além do mais, o encadeador também pode ser uma porção poli(etileno glicol), conforme mostrado por exemplo, na publicação de patente internacional No. WO04/081026.

[00558] Exemplos não limitantes de polipeptídeos os quais compreendem ou consistem em dois ou mais domínios variáveis únicos de imunoglobulina anti-CX3CR1 são dados na Tabela 8a.

**TABELA 8A: POLIPEPTÍDEOS ANTI-CX3CR1 BIVALENTES**

CX3CR1 BII007	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGW- FRQAPGKERAFVAGISGSASRKYYADSVKGRFTVSRD- NARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAASNSYPKVQFDYY- GQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG- SGGGGSGGGGSKVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAT- SGTIFSNAMGWYRQAPGKKRDLVASISSSGSTNYAD- SVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNLSLKPEDTGYYCTLD- ARRGWNTAYWGQGAQVTVSS	SEQ ID NO:	267
CX3CR1 BII009	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNAMGWY- RQAPGKKRDLVASISSSGSTNYADSVKGRFTVSRDNDK- NTGYLQMNLSLKPEDTGYYCTLDARRGWNTAYWGQG- AQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG- GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRT- FSSYAMGWFRQAPGKERAFVAGISGSASRKYYADSVK- GRFTVSRDNARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAASNSY- PKVQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	268
CX3CR1 BII012	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSIFSSNAMAWY- RQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTISRDNAL- NTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQG- TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG- SGGGGSKVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSN- NAMGWYRQAPGKKRDLVASISS- GSTNYADSVKGRFTVSRDNDKNTGYLQMNLSL- PEDTGYYCTLDARRGWNTAYWGQGAQVTVSS	SEQ ID NO:	269
CX3CR1	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA-	SEQ ID	270

BII016	WYRQAPGKQRDLVAVINSVGITKYADSVKGRFTISGD- NAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDAR- RGWDTRYWGQGT- QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMA WYRQAPGKQRDLVAVINSVGIT- KYADSVKGRFTISGDNAKNTVYLMNSLKPEDTA- VYYCTSDARRGW DTRYWGQGTQVTVSS	NO:	
CX3CR1 BII017	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WY- YRQAPPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTISSDN- AKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCTSDGRRGW DTRYWG- QGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG- GGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASG- SIFSSNAMA WYRQAPPGKQRDLVALINSVGITKYADS- VKGRFTISSDNAKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCTSD- GRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	271
CX3CR1 BII018	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WY- YRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTISRDN- AKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQ- GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG- GGGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIF- SSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGR- FTISRDN AKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW- DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	272
CX3CR1 BII019	EMQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA- WYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTISRDN- AKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDGRRGW DTRYW- GQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG- SGGGGSGGGGSEMQLVESGGGSVQAGESLRLSCAAS- GSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADS- VKGRFTISRDN AKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDGR- RGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	273
CX3CR1 BII020	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WY- RQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTISRDN AK- NTAYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQ- TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG- GGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIF- SSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRF- TISRDN AKNTAYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW D- TRYWGQGTTLVTVSS	SEQ ID NO:	274
CX3CR1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGW-	SEQ ID	275

BII026	FRQAPGKERAFVAGISGSASRKYADSVKGRFTVSRD-NARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASNSYPKVQFDYYG-QGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASG-SIFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSV-KGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSDPR-RGWDTRYWGQGTQVTVSS	NO:	
CX3CR1 BII027	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGW-FRQAPGKERAFVAGISGSASRKYADSVKGRFT-VSRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASNSYPKVQFDYYGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAWYRQAPGKQRDLVAGINSVG-ITKYADSVKGRFTISRDNANTAYLQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	276
CX3CR1 BII006	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERAFVAGISGSASRKYADSVKGRFTVSRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASNSYPKVQFDYYGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERAFVAGISGSASRKYADSVKGRFTVSRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASNSYPKVQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	282

[00559] Em outra modalidade, os no mínimo dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina do polipeptídeo da invenção são ligados uns aos outros através de outra porção (opcionalmente através de um ou dois encadeadores), tal como outro polipeptídeo o qual, em uma modalidade preferencial porém não limitante, pode ser um domínio variável único de imunoglobulina adicional conforme já descrito acima. A porção referida pode ou ser essencialmente inativa ou pode ter um efeito biológico tal como aprimoramento das propriedades desejadas do polipeptídeo ou pode conferir uma ou mais propriedades desejadas adicionais ao polipeptídeo. Por exemplo, e sem limitação, a porção pode aumentar a meia-vida da proteína ou do polipeptídeo, e/ou pode reduzir sua imunogenicidade ou aprimorar qualquer outra propriedade desejada.

[00560] Em um aspecto, um polipeptídeo da invenção inclui, especi-

almente quando usado como um agente terapêutico, uma porção a qual prolonga a meia-vida do polipeptídeo da invenção no soro ou em outros fluidos corporais de um paciente. O termo "meia-vida" significa o tempo que leva para a concentração sérica do polipeptídeo (modificado) reduzir por 50%, *in vivo*, por exemplo, devido à degradação do polipeptídeo e/ou ao clearance e/ou à sequestração por mecanismos naturais.

[00561] De acordo com uma modalidade adicional da invenção, os dois domínios variáveis únicos de imunoglobulina podem ser fundidos a uma molécula de albumina sérica, tal como descrito por exemplo, nas publicações de patente internacional Nos. WO01/79271 e No. WO03/59934.

[00562] Alternativamente, a referida porção de prolongamento da meia-vida pode ser ligada de modo covalente ou fundida ao referido polipeptídeo e pode ser, sem limitação, uma porção Fc, uma porção albumina, um fragmento de uma porção albumina, uma porção de ligação de albumina, tal como um domínio variável único de imunoglobulina anti-albumina, uma porção de ligação de transferrina, tal como um domínio variável único de imunoglobulina anti-transferrina, uma molécula de polioxialquileno, tal como uma molécula de polietileno glicol, um peptídeo de ligação de albumina, ou derivados de hidroxietil amido (HES).

[00563] Em outro aspecto, o polipeptídeo da invenção compreende uma porção a qual liga a um antígeno encontrado no sangue, tal como albumina sérica, imunoglobulinas do soro, proteína de ligação de tiroxina, fibrinogênio ou transferrina, deste modo conferindo uma aumentada meia-vida *in vivo* ao polipeptídeo resultante da invenção. De acordo com uma modalidade, a porção referida é uma imunoglobulina de ligação de albumina e, em particular, um domínio variável único de imunoglobulina de ligação de albumina tal como um domínio VHH de

ligação de albumina.

[00564] Em outra modalidade, o polipeptídeo da invenção compreende uma porção a qual liga a albumina sérica, em que a porção referida é um peptídeo de ligação de albumina, conforme descrito por exemplo, nas publicações de patente internacional Nos. WO2008/068280 e WO2009/127691.

[00565] Caso pretendido para utilização em seres humanos, o referido domínio variável único de imunoglobulina de ligação de albumina (também denominado domínio variável único de imunoglobulina anti-albumina) preferencialmente ligará à albumina sérica humana e preferencialmente será um domínio VHH de ligação de albumina humanizado.

[00566] Domínios variáveis únicos de imunoglobulina ligando a albumina sérica humana são conhecidos na técnica e são descritos em detalhes adicionais, por exemplo, na publicação de patente internacional No. WO2006/122786. Um domínio VHH de ligação de albumina especificamente útil consiste em ou contém a sequência de aminoácidos conforme estipulado em qualquer uma de SEQ ID NO: 230 a 232:

**TABELA 8B**

ALB-1	AVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFT-FRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSIS-GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNACTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	230
ALB-11 (humanized ALB-1)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFT-FSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS-GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNACTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	231
ALB-2	AVQLVESGGGLVQGGSLRLACAASERIFDLNLMGWYRQGPGNERELVATCITVGDSTNYADSVKGRFTISMDYTKQTVYLHNSLRPEDTGLYYCKIRRTWHSELWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	232

[00567] De acordo com uma modalidade, um polipeptídeo da invenção pode ser ligado a uma ou mais partes de anticorpo, fragmentos ou domínios que conferem uma ou mais funções efetoras ao polipeptídeo da invenção e/ou podem conferir a capacidade para ligar a um ou mais receptores de Fc. Por exemplo, para este fim, e sem ser limitado a isto, as partes de anticorpo podem ser ou podem compreender domínios CH2 e/ou CH3 de um anticorpo, tal como de um anticorpo de cadeia pesada (conforme descrito acima) e mais preferencialmente de um anticorpo de 4 cadeias humano convencional; especificamente, o polipeptídeo da invenção pode ser ligado a uma região Fc, por exemplo, de IgG humana, de IgE humana ou de outra Ig humana. Por exemplo, a publicação de patente internacional No. WO 94/04678 descreve anticorpos de cadeia pesada compreendendo um domínio VHH Camélideo ou um derivado humanizado do mesmo, no qual o domínio CH2 e/ou CH3 Camelidae foram substituídos por domínios CH2 e/ou CH3 humanos, de modo a proporcionar uma imunoglobulina que consiste em 2 cadeias pesadas, cada uma compreendendo um domínio VHH - opcionalmente humanizado - e domínios CH2 e CH3 humanos (mas não domínio CH1), cuja imunoglobulina tem a função efetora proporcionada pelos domínios CH2 e CH3, pode funcionar sem a presença de quaisquer cadeias leves, e tem uma meia-vida aumentada em comparação com os domínios VHH correspondentes sem a modificação referida.

[00568] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção compreende dois VHHs anti-CX3CR1 e um VHH capaz de ligação a albumina sérica. Em um aspecto, os VHHs são fundidos usando peptídeos encadeadores. Exemplos típicos de semelhantes polipeptídeos da presente invenção são mostrados nas partes que se seguem.

[00569] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção

compreende um primeiro VHH anti-CX3CR1 fundido a um primeiro peptídeo encadeador, o qual é o próprio fundido a um VHH capaz de ligação a albumina sérica, o qual é o próprio fundido a um segundo peptídeo encadeador, o qual é o próprio fundido a um segundo VHH anti-CX3CR1. Em um aspecto, o primeiro ou o segundo peptídeo encadeador é um encadeador de 9GS, em um aspecto, o primeiro e o segundo peptídeo encadeador é um encadeador de 9GS. Em um aspecto, o VHH capaz de ligação a albumina sérica é capaz de ligação a albumina sérica humana. Em um aspecto, o VHH capaz de ligação a albumina sérica tem a sequência de aminoácidos estipulada em SEQ ID NO: 231. Em um aspecto, o primeiro e o segundo VHH anti-CX3CR1 têm a mesma sequência de aminoácidos. Em um aspecto, o primeiro ou o segundo VHH anti-CX3CR1 tem a CDR1, a CDR2 e a CDR3 estipuladas em:

[00570] - SEQ ID NO's: 213, 214 e 186; ou

[00571] - SEQ ID NO's: 213, 221 e 186; ou

[00572] - SEQ ID NO's: 141, 162 e 186.

[00573] Em um aspecto, o primeiro e o segundo VHH anti-CX3CR1 têm a CDR1, a CDR2 e a CDR3 estipuladas em:

[00574] - SEQ ID NO's: 213, 214 e 186; ou

[00575] - SEQ ID NO's: 213, 221 e 186; ou

[00576] - SEQ ID NO's: 141, 162 e 186.

[00577] Em um aspecto, o primeiro ou o segundo VHH anti-CX3CR1 tem a sequência de aminoácidos estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO: 138 a 140 ou SEQ ID NO: 222 a 224. Em um aspecto, o primeiro e o segundo VHH anti-CX3CR1 têm a mesma sequência de aminoácidos, em que a referida sequência de aminoácidos é a sequência estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO: 138 a 140 ou SEQ ID NO: 222 a 224.

[00578] Exemplos não limitantes de polipeptídeos da presente in-

venção são os polipeptídeos de qualquer uma de SEQ ID NO: 225 a 227, 249 ou 277 a 281.

**TABELA 9**

CX3CR1 BII00312	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI- FSSTAMAWYRQAPGKRRDLVAAISSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLR- PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQG- TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES- GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR- QAPGKGLEWVSSISGSGS- DTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNSLR- PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG- TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES- GGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYR- QAPGKRRDLVAAISS- VGVTKYADSVKGRFTISRDNKNTVLQNSLRP- EDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO:	225
CX3CR1 BII00313	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI- FSSTAMAWYRQAPGKRRDLVAAISTVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLR- PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQG- TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES- GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR- QAPGKGLEWVSSISGSGS- DTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNSLR- PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG- TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES- GGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYR- QAPGKRRDLVAAISTVGVTKYADSVKGRFTIS- RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTSD- PRRGWDTRYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO:	226
CX3CR1 BII00314	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSS- NAM- AWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRFT- ISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTSD- PRRG- WDTRYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL- VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFG-	SEQ ID NO:	227

	MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS- DTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLR- PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG- TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES- GGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMAWYR- QAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTIS- RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTSD- PRRGWDTRYWGQGLTVTVSS		
CX3CR1 BII032	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLK- PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGT- QVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQA- GESLRLSCAASGSIFSSNAMAWYR- QAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTIS- RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSD- PRRGWDTRYWGQGT- QVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES- GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR- QAPGKGLEWVSSISGSGS- DTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLR- PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS	SEQ ID NO:	277
CX3CR1 BII034	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNA- MAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT- KYADSVKGRF- TISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSD- PRRGWDTRYWGQGT- QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLR- LSCAASGSIFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAA- INSVGVTKYADSVKGRFTISR- NAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSD- PRRGWDTRYWGQGT- QVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES- GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR- QAPGKGLEWVSSISGSGS- DTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLR- PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS	SEQ ID NO:	278
CX3CR1	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS-	SEQ	249

BII036	<p>NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT-          KYADSVKGRFTIS-          RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY-          CTSDPRRGWDTRYWGQG-          TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES-          GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR-          QAPGKGLEWVSSISGSGS-          DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR-          PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG-          TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQA-          GESLRLSCAASGSIFSSNAMAWYR-          QAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTIS-          RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSD-          PRRGWDTRYWGQGTTLTVSS</p>	ID NO:	
CX3CR1 BII040	<p>EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS-          NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT-          KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLK-          PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGT-          QVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQA-          GESLRLSCAASGSIFSSNAMAWYR-          QAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTIS-          RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSD-          PRRGWDTRYWGQGT-          QVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG          SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR-          LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVS-          SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNT-          TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG-          TLVTVSS</p>	SEQ ID NO:	279
CX3CR1 BII041	<p>EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS-          NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVT-          KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLK-          PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGT-          QVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG          SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLR-          LSCAASGSIFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAA-          INSVGVTKYADSVKGRFTISR-          NAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSD-          PRRGWDTRYWGQGT-</p>	SEQ ID NO:	280

	QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR- LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVS- SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKT- TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG- TLVTVSS		
CX3CR1 BII042	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS- NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVMGT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLK- PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGT- QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR- LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVS- SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKT- TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG- TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESL- RLSCAASGSIFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAA- INSMGTKYADSVKGRFTISR- DNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSD- PRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO:	281

[00579] Em outro aspecto, um polipeptídeo da presente invenção compreende um VHH anti-CX3CR1 e um domínio de Fc. Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção compreende um VHH anti-CX3CR1 fundido a um peptídeo encadeador, o qual é o próprio fundido a um domínio de Fc. Em um aspecto, o peptídeo encadeador é um encadeador de 15GS. Em um aspecto, o domínio de Fc tem a sequência de aminoácidos estipulada em SEQ ID NO: 250 ou 252. Em um aspecto, o VHH tem a CDR1, a CDR2 e a CDR3 estipuladas em:

[00580] - SEQ ID NO's: 213, 214 e 186; ou

[00581] - SEQ ID NO's: 213, 221 e 186; ou

[00582] - SEQ ID NO's: 141, 162 e 186.

[00583] Em um aspecto, o VHH tem a sequência de aminoácidos estipulada em qualquer uma de SEQ ID NO: 138 a 140 ou SEQ ID NO: 222 a 224. Em um aspecto o polipeptídeo está sob a forma de um díme-

ro, por exemplo, em que o dímero é formado por uma ou mais pontes de dissulfeto.

[00584] Exemplos não limitantes de polipeptídeos da presente invenção são os polipeptídeos de SEQ ID NO: 251, 253 ou 254.

**TABELA 10**

Domínio de Fc de camundongo	PPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI LSPIVTCVVAVSEDDPDVQISWFV- NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI- QHQDWMSGKEFKCKVNN- KDLPAPIERTISKPK- GSVRAPQVYVLPPEEEMTK- KQVTLTCMVTDMPEDIYVEW- TNNKTELNYKNTEPVLSDSGSYFM- YSKLRVEKKNWVERNSYSCS- VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	SEQ ID NO:	250
66B02-mFc	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSI- FSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAAINS- VGVTKYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ- MNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW- DTRYWGQGTLVTVSSG- GGGSGGGGSGGGGSPCKCPAPNLLGG- PSVFIFPPKIKDVLMI LSPIVTC- VVAVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT- QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD- WMSGKEFKCKVNNKDLPA- PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTK- KQVTLTCMVTDMPEDIYVEW- TNNKTELNYKNTEPVLSDSGSYFMYSKL- RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT- KSFSRTPGK	SEQ ID NO:	251
Domínio Fc humano	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS- RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD- GVEVHNAKTKPREEQYNS-	SEQ ID NO:	252

	TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN- KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS- REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES- NGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD- KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS- LSLSPGK		
306D- hFc	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI- FSSTAMAWYRQAPGKRRDLVAAISSVGV- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLR- PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQG- TLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSCPPCPA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS- RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD- GVEVHNAKTKPREEQYNS- TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN- KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS- REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES- NGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD- KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS- LSLSPGK	SEQ ID NO:	253
307D- hFc	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI- FSSTAMAWYRQAPGKRRDLVAAISTVGV- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLR- PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQG- TLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSCPPCPA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS- RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD- GVEVHNAKTKPREEQYNS- TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN- KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS- REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES- NGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVD- KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS- LSLSPGK	SEQ ID NO:	254



	NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPR- RGWDTRYWGQGLTVTVSS		
CX3CR1BI I00313 (D1A)	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTA- MAWYRQAPGKRRDLVAAISTVGVTKYADS- VKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYC- TSDPRRGWDTRYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG- EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFG- MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK- GRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTIGG- SLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG- GGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYRQ- APGKRRDLVAAISTVGVTKYADSVKGRFTIS- RDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWD- TRYWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO:	258
CX3CR1BI I00314 (D1A)	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMA- WYRQAPGKRRDLVAAINSVMGVTKYADSVKGRF- TISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPR- RGWDTRYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEV- QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS- WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF- TISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTIG- GSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEV- QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS- NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVMGVTKYAD- SVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTS- DPRRGWDTRYWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO:	259
CX3CR1BI I00312 (D1V)	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTA- MAWYRQAPGKRRDLVAAISSVMGVTKYADS- VKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYC- TSDPRRGWDTRYWGQGLTVTVSSGGGGSGG- GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF- SSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD- TLYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTA- VYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGG- GGSGGGSEVQVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS- GSIFSSTAMAWYRQAPGKRRDLVAAISSVMGVT- KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPED- TAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO:	260
CX3CR1BI I00313 (D1V)	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTA- MAWYRQAPGKRRDLVAAISTVGVTKYADSVK- GRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTA- VYYCTSDPRRGWDTRYWGQGLTVTVSSG-	SEQ ID NO:	261

	GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL- SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS- GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNACTT- LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTL- VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV- QPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYRQAPGKR- RDLVAAISTVGVTKYADSVKGRFTISRDSKNTVYLQ- MNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQG- TLVTVSS		
CX3CR1BI I00314 (D1V)	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS- NAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADS- VKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDT- AVYYCTSDPRRGWDTRYWGQG- TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL- RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQA- PGKGLEWVSSISGSGS- DTLYADSVKGRFTISRDNACTTLYLQMNSLRPEDTA- VYYCTIGGSLRSSQGTLVTVSSGGG- GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIF- SSNAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSV- GVTKYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQM- NSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQG- TLVTVSS	SEQ ID NO:	262

**TABELA 12**

306D-hFc (D1A)	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISSTA- MAWYRQAPGKRRDLVAAISSVGV- TKYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLR- PEDTAVYYC- TSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSSG- GGGSGGGGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPS- VFLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHED- PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST- YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA- LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE- MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN- GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV- DKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLS- LSPGK	SEQ ID NO:	263
307D-hFc (D1A)	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI- FSSTAMAWYRQAPGKRRDLVAAISTVG- VTKYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNS- LRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTL-	SEQ ID NO:	264

	<p>VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSCPPCPAPE-  AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD-  VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE-  QYNSTYRVVSLTVLHQDWLNGKEYKCK-  VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS-  REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-  VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG-  SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV-  FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>		
306D-hFc (D1V)	<p>VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIF-  SSTAMAWYRQAPGKRRDLVAISSVGVT-  KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLR-  PEDTAVYYTSDPRRGWDTRYWGQG-  TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSCPPCPAPE-  AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV-  DVSHEDPEVKFNWYVDGV-  EVHNAKTKPREEQYNS-  TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL-  PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT-  KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN-  GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK-  LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT-  QKSLSLSPGK</p>	SEQ ID NO:	265
307D-hFc (D1V)	<p>VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI-  FSSTAMAWYRQAPGKRRDLVAISTVGVT-  KYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLR-  PEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQG-  TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSCPPCPAPE-  AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV-  DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE-  QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN-  KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS-  REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN-  GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS-  RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS-  LSPGK</p>	SEQ ID NO:	266

[00587] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção é caracterizado por uma ou mais das seguintes propriedades:

- Liga com alta afinidade à CX3CR1 humana;

- Inibe a ligação de fractalcina solúvel à CX3CR1 humana;
- Inibe a quimiotaxia induzida pela fractalcina;
- Inibe a internalização de receptores de CX3CR1 humana induzida pela fractalcina;

- Tem reação cruzada com CX3CR1 cyno dentro de 10 vezes da E/IC<sub>50</sub> para CX3CR1 humana para ligação e inibição funcional.

[00588] Por conseguinte, em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção tem uma afinidade para CX3CR1 humana a uma IC<sub>50</sub> menos de ou igual a 10 nM, ou menos de ou igual a 5 nM, ou menos de ou igual a 2,5 nM ou menos de ou igual a 1 nM, conforme determinado por FACS de competição.

[00589] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção tem uma afinidade para CX3CR1 humana a uma EC<sub>50</sub> de menos de ou igual a 10 nM, ou menos de ou igual a 5 nM, ou menos de ou igual a 2,5 nM ou menos de ou igual a 1 nM, conforme determinado por FACS de ligação celular.

[00590] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção bloqueia a ligação de CX3CR1 humana à fractalcina humana a ou acima de 50%, ou a ou acima de 60%, ou a ou acima de 70%, ou a ou acima de 80%, ou a ou acima de 90%, ou a ou acima de 95% conforme determinado por FACS de competição com fractalcina humana.

[00591] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção bloqueia a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana a uma IC<sub>50</sub> de menos de ou igual a 300 nM, ou menos de ou igual a 100 nM, ou menos de ou igual a 20 nM, ou menos de ou igual a 10 nM, menos de ou igual a 5 nM, menos de ou igual a 2,5 nM ou menos de ou igual a 1 nM conforme determinado por FACS de competição com fractalcina humana.

[00592] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção inibe a quimiotaxia induzida pela fractalcina mediada pela

CX3CR1 humana a ou acima de 10%, ou a ou acima de 30%, ou a ou acima de 40%, ou a ou acima de 50%, ou a ou acima de 60%, ou a ou acima de 70%, ou a ou acima de 80%, ou a ou acima de 90%.

[00593] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção inibe a quimiotaxia induzida pela fractalcina mediada pela CX3CR1 humana a uma IC<sub>50</sub> de menos de ou igual a 500 nM, ou de menos de ou igual a 100 nM, ou menos de ou igual a 75 nM, ou menos de ou igual a 50 nM, ou menos de ou igual a 10 nM ou menos de ou igual a 5 nM.

[00594] Em um aspecto adicional, um polipeptídeo da presente invenção inibe a internalização de receptor da CX3CR1 humana induzida pela fractalcina a uma IC<sub>50</sub> de menos de ou igual a 10 nM, ou menos de ou igual a 5 nM ou ou menos de ou igual a 1 nM.

[00595] De acordo com ainda outra modalidade, uma modificação de prolongação da meia-vida de um polipeptídeo da invenção (a referida modificação também reduzindo a imunogenicidade do polipeptídeo) compreende a ligação de um polímero farmacologicamente aceitável adequado, tal como poli(etileno glicol) (PEG) de cadeia reta ou ramificada ou derivados do mesmo (tais como metoxipoli(etileno glicol) ou mPEG). De modo geral, pode ser usada qualquer forma adequada de PEGuilação, tal como a PEGuilação usada na técnica para anticorpos e fragmentos de anticorpos (incluindo mas não limitados a anticorpos de domínio e scFv's); é feita referência, por exemplo, a: Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese e Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003); Harris e Chess, Nat. Rev. Drug Discov. 2 (2003); publicação de patente internacional No. WO 04/060965; e patente dos Estados Unidos No. US6.875.841.

[00596] Vários reagentes para PEGuilação de polipeptídeos também estão disponíveis comercialmente, por exemplo, na Nektar Therapeutics, EUA, ou na NOF Corporation, Japão, tais como as EA Seri-

es, SH Series, MA Series, CA Series, e ME Series da Sunbright®, tais como Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA, e Sunbright® ME-400MA.

[00597] Preferencialmente, é usada PEGuilação sítio-direcionada, em particular através de um resíduo cisteína (vide, por exemplo, Yang et al., Protein Engineering 16, 761-770 (2003)). Por exemplo, para este fim, PEG pode ser ligado a um resíduo cisteína que ocorre naturalmente em um polipeptídeo da invenção, um polipeptídeo da invenção pode ser modificado de modo a introduzir adequadamente um ou mais resíduos cisteína para ligação de PEG, ou uma sequência de aminoácidos compreendendo um ou mais resíduos cisteína para ligação de PEG pode ser fundida ao N- e/ou C-término e/ou PEG pode ser ligado a uma região de encadeador que faz ponte entre dois ou mais domínios funcionais de um polipeptídeo da invenção, todas usando técnicas de engenharia de proteína conhecidas per se pela pessoa versada.

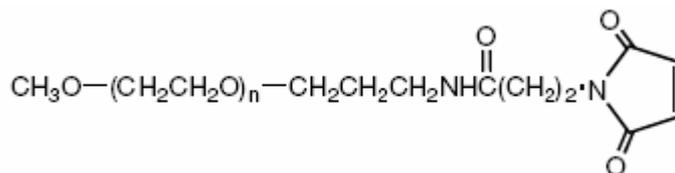
[00598] Preferencialmente, para os polipeptídeos da invenção, é usado um PEG com um peso molecular de mais de 5 kDa, tal como mais de 10 kDa e menos de 200 kDa, tal como menos de 100 kDa; por exemplo, na faixa de 20 kDa a 80 kDa.

[00599] Com respeito à PEGuilação, deve ser observado que, de modo geral, a invenção também engloba qualquer polipeptídeo da invenção que tenha sido PEGuilado em uma ou mais posições de aminoácido, preferencialmente em um modo tal que a referida PEGuilação ou (1) aumenta a meia-vida in vivo; (2) reduz a imunogenicidade; (3) proporciona uma ou mais propriedades benéficas adicionais conhecidas per se para PEGuilação; (4) não afeta essencialmente a afinidade do polipeptídeo para CX3CR1 (por exemplo, não reduz a referida afinidade por mais de 50%, e mais preferencialmente não por mais de 10%, conforme determinado por um teste adequado, tais como os descritos nos Exemplos abaixo); e/ou (4) não afeta qualquer uma das

outras propriedades desejadas dos polipeptídeos da invenção. Grupos PEG adequados e métodos para a ligação dos mesmos, quer especificamente ou não especificamente, serão evidentes para a pessoa versada.

[00600] De acordo com uma modalidade especificamente preferencial da invenção, um polipeptídeo PEGuilado da invenção inclui uma porção PEG de PEG linear tendo um peso molecular de 40 kDa ou 60 kDa, em que a porção PEG é ligada ao polipeptídeo em uma região de encadeador e, especificamente, em um resíduo Cys, por exemplo, na posição 5 de um peptídeo encadeador de GS8 conforme mostrado em SEQ ID NO: 235.

[00601] Exemplos preferenciais de polipeptídeos PEGuilados da invenção são PEGuilados preferencialmente com um dos reagentes PEG conforme mencionado acima, tal como "Sunbright® ME-400MA" conforme mostrado na fórmula química que se segue:



[00602] o qual tem um peso molecular médio de 40 kDa.

### **Utilizações terapêuticas**

[00603] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um polipeptídeo da presente invenção ou uma composição farmacêutica compreendendo o referido polipeptídeo para uso como um medicamento.

[00604] Em um aspecto, a presente invenção proporciona o uso de um polipeptídeo da presente invenção ou uma composição farmacêutica compreendendo o referido polipeptídeo para o tratamento ou a profilaxia de distúrbios ateroscleróticos cardio- e cerebrovasculares, doença arterial periférica, restenose, nefropatia diabética, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescente humana, nefropatia por IgA, nefro-

patia membranosa, nefrite lúpica, vasculite incluindo púrpura de Henoch-Schonlein e granulomatose de Wegener, artrite reumatoide, osteoartrite, rejeição de aloenxerto, esclerose sistêmica, distúrbios neurodegenerativos e doença desmielinizante, esclerose múltipla (em inglês, MS), mal de Alzheimer, doenças pulmonares tais como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, dor neuropática, dor inflamatória, ou câncer.

[00605] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona o uso de um polipeptídeo da presente invenção ou uma composição farmacêutica compreendendo o referido polipeptídeo para o tratamento ou a profilaxia de aterosclerose.

[00606] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona o uso de um polipeptídeo da presente invenção ou uma composição farmacêutica compreendendo o referido polipeptídeo para o tratamento ou a profilaxia de aterosclerose por prevenção e/ou redução da formação de novas lesões ou placas ateroscleróticas e/ou por prevenção ou diminuição da progressão de lesões e placas existentes.

[00607] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona o uso de um polipeptídeo da presente invenção ou uma composição farmacêutica compreendendo o referido polipeptídeo para o tratamento ou a profilaxia de aterosclerose por modificação da composição das placas de modo a reduzir o risco de ruptura de placas e de eventos ateroscleróticos.

[00608] Em um aspecto, a presente invenção também proporciona um método de tratamento, ou redução do risco de, distúrbios ateroscleróticos cardio- e cerebrovasculares, doença arterial periférica, restenose, nefropatia diabética, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescente humana, nefropatia por IgA, nefropatia membranosa, nefrite lúpica, vasculite incluindo púrpura de Henoch-Schonlein e granulomatose de Wegener, artrite reumatoide, osteoartrite, rejeição de aloenxerto,

esclerose sistêmica, distúrbios neurodegenerativos e doença desmielinizante, esclerose múltipla (em inglês, MS), mal de Alzheimer, doenças pulmonares tais como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, dor neuropática, dor inflamatória, ou câncer, em uma pessoa sofrendo de ou em risco de, a referida doença ou condição, em que o método compreende administrar à pessoa uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção ou uma composição farmacêutica compreendendo o referido polipeptídeo.

[00609] Em um aspecto, a presente invenção também proporciona um método de tratamento, ou redução do risco de aterosclerose em uma pessoa sofrendo de ou em risco de, a referida doença ou condição, em que o método compreende administrar à pessoa uma quantidade terapêuticamente eficaz de polipeptídeo da presente invenção ou uma composição farmacêutica compreendendo o referido polipeptídeo.

[00610] Em um aspecto, a presente invenção também proporciona um método de tratamento, ou redução do risco de aterosclerose por prevenção e/ou redução da formação de novas lesões ou placas ateroscleróticas e/ou por prevenção ou diminuição da progressão de lesões e placas existentes em uma pessoa sofrendo de ou em risco de, a referida doença ou condição, em que o método compreende administrar à pessoa uma quantidade terapêuticamente eficaz de polipeptídeo da presente invenção ou uma composição farmacêutica compreendendo o referido polipeptídeo.

[00611] Em um aspecto, a presente invenção também proporciona um método de tratamento, ou redução do risco de aterosclerose por modificação da composição das placas de modo a reduzir o risco de ruptura de placas e eventos aterotrombóticos em uma pessoa sofrendo de ou em risco de, a referida doença ou condição, em que o método compreende administrar à pessoa uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo da presente invenção ou uma composição

farmacêutica compreendendo o referido polipeptídeo.

[00612] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção é indicado para utilização no tratamento ou na profilaxia de uma doença ou um distúrbio que é associado com CX3CR1.

[00613] Em um aspecto, um polipeptídeo da presente invenção é indicado para utilização no tratamento ou na profilaxia de doenças ou condições nas quais é desejável a modulação da atividade no receptor de CX3CR1. Em um aspecto, a presente invenção também proporciona um método de tratamento, ou redução do risco de, doenças ou condições nas quais o antagonismo do receptor de CX3CR1 é benéfico o qual compreende administrar a uma pessoa sofrendo de ou em risco de, a referida doença ou condição, um polipeptídeo da presente invenção.

[00614] Espera-se que a profilaxia seja particularmente relevante para o tratamento de pessoas que sofreram de um episódio prévio de, ou são consideradas de modo diverso como estando em risco aumentado de, a doença ou condição em questão. Pessoas em risco de desenvolver uma doença ou condição em particular geralmente incluem aquelas tendo um histórico familiar da doença ou condição, ou aquelas que foram identificadas por teste genético ou triagem como sendo particularmente suscetíveis a desenvolver a doença ou condição.

[00615] No contexto da presente invenção, o termo "prevenção, tratamento e/ou mitigação" não somente compreende prevenção e/ou tratamento e/ou mitigação da doença, mas também compreende geralmente prevenção do início da doença, diminuição ou reversão do progresso da doença, prevenção ou desaceleração do início de um ou mais sintomas associados com a doença, redução e/ou mitigação de um ou mais sintomas associados com a doença, redução da gravidade e/ou da duração da doença e/ou de quaisquer sintomas associados com a mesma e/ou prevenção de um aumento posterior na gravidade

da doença e/ou de quaisquer sintomas associados com a mesma, prevenção, redução ou reversão de qualquer dano fisiológico causado pela doença, e de modo geral qualquer ação farmacológica que é benéfica para o paciente sendo tratado.

[00616] O indivíduo a ser tratado será um mamífero, e mais particularmente um ser humano. Conforme será evidente para a pessoa versada, o indivíduo a ser tratado será em particular uma pessoa sofrendo de, ou em risco de, as doenças, os distúrbios ou as condições mencionados aqui, neste requerimento de patente.

[00617] Além disso será evidente para a pessoa versada que os métodos de tratamento de uma doença acima incluem a preparação de um medicamento para o tratamento da referida doença. Além do mais, é evidente que os polipeptídeos da invenção podem ser usados como um ingrediente ativo em um medicamento ou em uma composição farmacêutica pretendidos para o tratamento das doenças acima. Deste modo, a invenção também se refere ao uso de um polipeptídeo da invenção na preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção, o tratamento e/ou a mitigação de qualquer uma das doenças, dos distúrbios ou das condições mencionados acima. A invenção adicionalmente se refere a um polipeptídeo da invenção para utilização terapêutica ou profilática e, especificamente, para a prevenção, o tratamento e/ou a mitigação de qualquer uma das doenças, dos distúrbios ou das condições mencionados acima. A invenção adicionalmente se refere a uma composição farmacêutica para a prevenção, o tratamento e/ou a mitigação das doenças, dos distúrbios ou das condições mencionados acima, em que a referida composição compreende no mínimo um polipeptídeo da invenção.

[00618] Os polipeptídeos da invenção e/ou as composições compreendendo os mesmos podem ser administrados a um paciente que necessite dos mesmos em qualquer maneira adequada, dependendo

da formulação farmacêutica específica ou da composição a ser usada. Deste modo, os polipeptídeos da invenção e/ou as composições compreendendo os mesmos podem ser administrados, por exemplo, por via intravenosa, por via subcutânea, por via intramuscular, por via intraperitoneal, por via transdérmica, por via oral, por via sublingual (por exemplo, sob a forma de um comprimido sublingual, spray ou gota colocada sob a língua e adsorvida através das membranas mucosas para dentro da rede de capilares sob a língua), por via (intra-)nasal (por exemplo, sob a forma de um spray nasal e/ou como um aerosol), topicamente, por meio de um supositório, por inalação, por via intravitreal (esp. para o tratamento de degeneração macular seca (em inglês, *dry AMD*) ou glaucoma), ou qualquer outra maneira adequada em uma quantidade ou dose eficaz.

[00619] Os polipeptídeos da invenção e/ou as composições compreendendo os mesmos são administrados de acordo com um regime de tratamento que é adequado para prevenção, tratamento e/ou mitigação da doença, do distúrbio ou da condição a ser prevenido, tratado ou mitigado. O médico geralmente será capaz de determinar um regime de tratamento adequado, dependendo de fatores tais como a doença, o distúrbio ou a condição a ser prevenido, tratado ou mitigado, a gravidade da doença, a gravidade dos sintomas da mesma, o polipeptídeo específico da invenção a ser usado, a via de administração específica e a formulação farmacêutica ou composição a ser usada, a idade, o sexo, o peso, a dieta, a condição geral do paciente, e fatores similares de conhecimento geral do médico. De modo geral, o regime de tratamento compreenderá a administração de um ou mais polipeptídeos da invenção, ou de uma ou mais composições compreendendo os mesmos, em quantidades ou doses terapêuticamente e/ou profilaticamente eficazes.

[00620] De modo geral, para a prevenção, o tratamento e/ou a miti-

gação das doenças, dos distúrbios e das condições mencionados aqui, neste requerimento de patente, e dependendo da doença, do distúrbio ou da condição específico a ser tratado, da potência do polipeptídeo específico da invenção a ser usado, da via de administração específica e da formulação farmacêutica ou composição específica usada, os polipeptídeos da invenção geralmente serão administrados em uma quantidade entre 0,005 e 20,0 mg por quilograma de peso corporal e dose, preferencialmente entre 0,05 e 10,0 mg/kg/dose, e mais preferencialmente entre 0,5 e 10 mg/kg/dose, ou continuamente (por exemplo, por infusão) ou como doses únicas (tais como por exemplo, doses diária, semanais, ou mensais; cf. abaixo), mas podem variar significativamente, especialmente, dependendo dos parâmetros acima mencionados.

[00621] Para aplicações profiláticas, as composições contendo os polipeptídeos da invenção também podem ser administradas em dosagens similares ou ligeiramente menores. A dosagem também pode ser ajustada pelo médico do indivíduo no caso de qualquer complicação.

[00622] Dependendo do polipeptídeo da invenção específico e sua farmacocinética específica e outras propriedades, pode ser administrado diariamente, a cada dois, três, quatro, cinco ou seis dias, semanalmente, mensalmente, e semelhantes. Um regime de administração pode incluir tratamento semanal, de longo termo. Por "longo termo" se indica no mínimo duas semanas e preferencialmente meses, ou anos de duração.

[00623] A eficácia dos polipeptídeos da invenção, e de composições compreendendo os mesmos, pode ser testada usando qualquer teste in vitro adequado, teste celular, teste in vivo e/ou modelo animal conhecido per se, ou qualquer combinação dos mesmos, dependendo da doença específica envolvida. Testes e modelos animais adequados

serão evidentes para a pessoa versada, e por exemplo, incluem os testes e modelos animais usados nos Exemplos abaixo.

[00624] Para utilização farmacêutica, os polipeptídeos da invenção podem ser formulados como uma preparação farmacêutica compreendendo (i) no mínimo um polipeptídeo da invenção e (ii) no mínimo um veículo, diluente, excipiente, adjuvante, e/ou estabilizante farmacêuticamente aceitável, e (iii) opcionalmente um ou mais polipeptídeos e/ou compostos farmacêuticamente ativos adicionais. Por "farmaceuticamente aceitável" se indica que o respectivo material não apresenta quaisquer efeitos biológicos ou indesejáveis de modo diverso quando administrados a um indivíduo e não interage em uma maneira prejudicial com qualquer um dos outros componentes da composição farmacêutica (tais como por exemplo, o ingrediente farmacêuticamente ativo) na qual está contido. Exemplos específicos podem ser encontrados em manuais de rotina, tais como por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing Company, EUA (1990). Por exemplo, os polipeptídeos da invenção podem ser formulados e administrados em qualquer maneira conhecida per se para anticorpos convencionais e fragmentos de anticorpos e outras proteínas farmacêuticamente ativas. Portanto, de acordo com uma modalidade adicional, a invenção se refere a uma composição farmacêutica ou preparação que contém no mínimo um polipeptídeo da invenção e no mínimo um veículo, diluente, excipiente, adjuvante e/ou estabilizante farmacêuticamente aceitável, e opcionalmente uma ou mais substâncias farmacêuticamente ativas adicionais.

[00625] Por meio de exemplos não limitantes, uma formulação semelhante pode estar em uma forma adequada para administração oral, para administração parenteral (tal como por injeção intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal, intracavernosa ou intraperitoneal ou por infusão intravenosa), para administração tópica, para adminis-

tração sublingual, para administração por inalação, por um emplastro de pele, por um implante, por um supositório, para administração transdérmica, nasal, intravitreal, retal ou vaginal, e semelhantes. As formas de administração adequadas referidas - as quais podem ser sólidas, semi-sólidas ou líquidas, dependendo da maneira de administração - bem como os métodos e veículos para utilização na preparação das mesmas, serão evidentes para a pessoa versada.

[00626] Preparações farmacêuticas para administração parenteral, tal como injeção intravenosa, intramuscular, subcutânea ou infusão intravenosa podem ser, por exemplo, soluções, suspensões, dispersões, emulsões, ou pós estéreis os quais compreendem o ingrediente ativo e os quais são adequados, opcionalmente depois de uma etapa adicional de dissolução ou diluição, para infusão ou injeção. Veículos ou diluentes adequados para as preparações referidas por exemplo incluem, sem limitação, água estéril e tampões e soluções aquosas farmacêuticamente aceitáveis tais como salina tamponada com fosfato fisiológica, soluções de Ringer, solução de dextrose, e solução de Hank; óleos de água; glicerol; etanol; glicóis tais como propileno glicol, bem como óleos minerais, óleos animais e óleos vegetais, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja, bem como misturas adequadas dos mesmos.

[00627] Soluções do composto ativo ou seus sais também podem conter um preservante para prevenir o crescimento de microorganismos, tais como agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerossal (tiomersal), e semelhantes. Em muitos casos, será preferencial incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, tampões ou cloreto de sódio. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, por meio da formação de lipossomas, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões ou pelo uso de surfatantes. Outros

agentes de retardamento da absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina, também podem ser adicionados.

[00628] Em todos os casos, a forma de dosagem final deve ser estéril, fluida e estável sob as condições de fabricação e armazenamento. Soluções injetáveis estéreis são preparadas incorporando o composto ativo na quantidade requerida no solvente apropriado com vários dos outros ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguidos por esterilização por filtro. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferenciais são as técnicas de secagem a vácuo e de secagem por congelamento (liofilização), as quais produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional presente nas soluções previamente filtradas estéreis.

[00629] Geralmente, serão preferenciais soluções ou suspensões aquosas. De modo geral, formulações adequadas para proteínas terapêuticas tais como os polipeptídeos da invenção são soluções de proteínas tamponadas, tais como soluções incluindo a proteína em uma concentração adequada (tal como de 0,001 a 400 mg/mL, preferencialmente de 0,005 a 200 mg/mL, mais preferencialmente de 0,01 a 200 mg/mL, mais preferencialmente de 1,0 a 100 mg/mL, tal como 1,0 mg/mL (administração i.v.) ou 100 mg/mL (administração s.c.) e um tampão aquoso tal como:

[00630] - salina tamponada com fosfato, pH 7,4,

[00631] - outros tampões de fosfato, pH 6,2 to 8,2,

[00632] - tampões de histidina, pH 5,5 to 7,0,

[00633] - tampões de succinato, pH 3,2 to 6,6, e

[00634] - tampões de citrato, pH 2,1 to 6,2,

[00635] e, opcionalmente, sais (por exemplo, NaCl) e/ou açúcares ou polialcoóis (tais como trealose, manitol, ou glicerol) para proporcionar a isotonicidade da solução.

[00636] Soluções de proteínas tamponadas preferenciais são soluções incluindo cerca de 0,05 mg/mL do polipeptídeo da invenção dissolvido em 25 mM de tampão de fosfato, pH 6,5, ajustadas para isotonicidade adicionando 220 mM de trealose. Além disso, outros agentes tais como um detergente, por exemplo, 0,02% de Tween-20 ou Tween-80, podem ser incluídos em semelhantes soluções. Formulações para aplicação subcutânea podem incluir concentrações significativamente maiores do polipeptídeo da invenção, tal como até 100 mg/mL ou mesmo acima de 100 mg/mL. No entanto, será evidente para a pessoa versada na técnica que os ingredientes e as quantidades dos mesmos conforme proporcionado acima somente representam uma opção preferencial. Alternativas e variações da mesma serão imediatamente evidentes para a pessoa versada, ou podem ser facilmente concebidas iniciando a partir da descrição acima.

[00637] Os polipeptídeos da invenção também podem ser administrados usando formulações de depósito, de liberação lenta ou de liberação gradual adequadas, por exemplo, adequadas para injeção, usando dispositivos de liberação controlada para implantação sob a pele, e/ou usando uma bomba de dosagem ou outros dispositivos conhecidos per se para a administração de substâncias ou princípios farmacologicamente ativos. Além disso, os polipeptídeos da invenção podem ser formulados sob a forma de um gel, de um creme, de um spray, de uma gota, de um emplastro ou de um filme o qual, caso colocado sobre a pele, passa através da pele.

[00638] Além disso, comparados com anticorpos convencionais ou fragmentos de anticorpos, uma importante vantagem do uso dos polipeptídeos da invenção é que também podem ser facilmente administrados através de vias diferentes da administração parenteral e podem ser facilmente formulados para semelhante administração. Por exemplo, conforme descrito no requerimento de patente internacional No.

WO2004/041867, semelhantes polipeptídeos podem ser formulados para administração oral, intranasal, intrapulmonar e transdérmica.

[00639] De acordo com outra modalidade da invenção é proporcionada uma combinação farmacêutica compreendendo no mínimo um polipeptídeo da invenção conforme descrito aqui, neste requerimento de patente, e no mínimo um outro agente terapêutico selecionado entre o grupo consistindo em estatinas, antiplaquetários, anticoagulantes, antidiabéticos e anti-hipertensivos.

[00640] A combinação farmacêutica referida opcionalmente e adicionalmente pode compreender um diluente, um excipiente, um adjuvante e/ou um estabilizante.

[00641] Quando duas ou mais substâncias ou princípios devem ser usados como parte de um regime de tratamento combinado, podem ser administrados através da mesma via de administração ou através de diferentes vias de administração, essencialmente ao mesmo tempo ou em momentos diferentes (por exemplo, essencialmente simultaneamente, consecutivamente, ou de acordo com um regime alternado). Quando as substâncias ou princípios devem ser administrados simultaneamente através da mesma via de administração, podem ser administrados como diferentes formulações ou composições farmacêuticas ou como parte de uma formulação ou composição farmacêutica combinada. Além disso, quando duas ou mais substâncias ou princípios ativos devem ser usados como parte de um regime de tratamento combinado, cada uma das substâncias ou dos princípios pode ser administrado na mesma quantidade e de acordo com o mesmo regime conforme usado quando o composto ou princípio é usado por si só, e a utilização combinada referida pode levar ou não a um efeito sinérgico. No entanto, quando a utilização combinada das duas ou mais substâncias ou princípios ativos leva a um efeito sinérgico, também pode ser possível reduzir a quantidade de uma, mais ou todas as substân-

cias ou princípios a serem administrados, enquanto ainda obtendo a ação terapêutica desejada. Isto pode ser útil, por exemplo, para evitar, limitar ou reduzir quaisquer efeitos colaterais indesejados que estão associados com o uso de uma ou mais das substâncias ou princípios quando são usados em suas quantidades usuais, enquanto ainda obtendo o efeito farmacêutico ou terapêutico desejado.

[00642] Ainda, uma modalidade adicional da invenção é um método para tratar as doenças e os distúrbios conforme estipulado acima, compreendendo administrar a um indivíduo, simultaneamente, separadamente ou sequencialmente, uma quantidade eficaz de no mínimo um polipeptídeo da invenção e no mínimo um agente selecionado entre o grupo consistindo em uma estatina, um antiplaquetário, um anticoagulante, um antidiabético e um anti-hipertensivo.

[00643] De acordo com um aspecto adicional da invenção, o polipeptídeo da invenção é preparado para ser administrado em combinação com outros fármacos usados para o tratamento das doenças e dos distúrbios estipulados acima, os outros fármacos referidos sendo selecionados entre o grupo consistindo em uma estatina, um antiplaquetário, um anticoagulante, um antidiabético e um anti-hipertensivo.

[00644] e acordo com ainda outro aspecto da invenção, fármacos usados para o tratamento das doenças e dos distúrbios estipulados acima, os fármacos referidos sendo selecionados entre o grupo consistindo em uma estatina, um antiplaquetário, um anticoagulante, um antidiabético e um anti-hipertensivo são preparados para serem administrados em combinação com o polipeptídeo da invenção.

[00645] De acordo com um aspecto adicional da invenção, o polipeptídeo da invenção é usado em combinação com um dispositivo útil para a administração do polipeptídeo, tal como uma seringa, caneta injetora, ou dispositivo diverso.

[00646] De acordo com ainda outra modalidade da invenção, é pro-

porcionado um método de diagnosticar uma doença, um distúrbio ou uma condição mediada pela disfunção de CX3CR1 compreendendo as etapas de:

[00647] a) obter uma amostra de um indivíduo, e

[00648] b) contatar, in vitro, a amostra com um polipeptídeo da invenção conforme definido acima, e

[00649] c) detectar a ligação do referido polipeptídeo com a referida amostra, e

[00650] d) comparar a ligação detectada na etapa (c) com um padrão, em que uma diferença na ligação relativa à referida amostra é diagnóstico de uma doença, um distúrbio ou uma condição caracterizada por disfunção de CX3CR1.

[00651] De acordo com outra modalidade da invenção, é proporcionado um método de diagnosticar uma doença, um distúrbio ou uma condição mediada pela disfunção de CX3CR1 compreendendo as etapas de:

[00652] a) obter uma amostra de um indivíduo, e

[00653] b) contatar a amostra com um polipeptídeo da invenção conforme definido acima;

[00654] c) determinar a quantidade de CX3CR1 na amostra; e

[00655] d) comparar a quantidade determinada na etapa (c) com um padrão, em que uma diferença na quantidade relativa à referida amostra é diagnóstico de uma doença, um distúrbio ou uma condição caracterizada por disfunção de CX3CR1.

[00656] Os métodos de diagnóstico acima também podem ser usados para monitorar a eficácia de um tratamento terapêutico de um indivíduo.

[00657] De acordo com outra modalidade da invenção, é proporcionado um kit para diagnosticar uma doença, um distúrbio ou uma condição mediada pela disfunção de CX3CR1, para utilização em um mé-

todo conforme definido acima, o kit referido compreendendo no mínimo um polipeptídeo da invenção e, opcionalmente, um ou mais meios, meios de detecção e/ou agentes de imagiologia *in vitro* ou *in vivo*, e, adicionalmente e opcionalmente, instruções de utilização. Agentes de imagiologia *in vivo* adequados incluem <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>Índio, <sup>123</sup>Iodo, e, para estudo por imagens de ressonância magnética, compostos paramagnéticos.

[00658] A invenção adicionalmente proporciona um kit compreendendo no mínimo um polipeptídeo da invenção e, adicionalmente, um ou mais componentes diversos selecionados entre o grupo consistindo em outros fármacos usados para o tratamento das doenças e dos distúrbios conforme descrito acima, e dispositivos conforme descrito acima.

[00659] A invenção adicionalmente proporciona métodos de fabricar um polipeptídeo da invenção, os métodos referidos geralmente compreendendo as etapas de:

[00660] - cultivar células hospedeiras compreendendo um ácido nucléico capaz de codificando um polipeptídeo da invenção (nas partes que se seguem: "ácido nucléico da invenção") sob condições que permitam a expressão do polipeptídeo da invenção; e,

[00661] - recuperar ou isolar o polipeptídeo expressado pelas células hospedeiras a partir da cultura; e

[00662] - opcionalmente adicionalmente purificar e/ou modificar e/ou formular o polipeptídeo da invenção.

[00663] Um ácido nucléico da invenção pode ser DNA genômico, cDNA ou DNA sintético (tal como DNA com um uso de códon que tenha sido especificamente adaptado para expressão na célula hospedeira pretendida ou no organismo hospedeiro pretendido). De acordo com uma modalidade da invenção, o ácido nucléico da invenção está em forma essencialmente isolada, conforme definido acima.

[00664] O ácido nucléico da invenção também pode estar sob a

forma de, estar presente em e/ou ser parte de um vetor, tal como por exemplo, um plasmídeo, um cosmídeo ou um YAC, o qual novamente pode estar em forma essencialmente isolada. O vetor pode ser especialmente um vetor de expressão, isto é, um vetor que pode proporcionar expressão do polipeptídeo *in vitro* e/ou *in vivo* (por exemplo, em uma célula hospedeira adequada, em um organismo hospedeiro adequado e/ou em um sistema de expressão adequado). O vetor de expressão referido geralmente compreende no mínimo um ácido nucléico da invenção que é ligado operavelmente a um ou mais elementos reguladores adequados, tais como um ou mais promotores, um ou mais reforçadores, um ou mais terminadores, e semelhantes. Exemplos específicos de semelhantes elementos reguladores e outros elementos, tais como um ou mais fatores de integração, um ou mais marcadores de seleção, uma ou mais sequências de sinal ou líder, um ou mais genes reporter, e semelhantes, úteis ou necessários para expressar os polipeptídeos da invenção, são descritos, por exemplo, às pp. 131 a 133 da publicação de patente internacional No. WO2006/040153.

[00665] Os ácidos nucléicos da invenção podem ser preparados ou obtidos em uma maneira conhecida per se (por exemplo, por síntese de DNA automatizada e/ou por tecnologia de DNA recombinante), com base na informação sobre as sequências de aminoácidos para os polipeptídeos da invenção proporcionada aqui, neste requerimento de patente, e/ou podem ser isolados a partir de uma fonte natural adequada.

[00666] De acordo com outra modalidade, a invenção se refere a um hospedeiro ou uma célula hospedeira que expressa ou é capaz de expressar um polipeptídeo da invenção; e/ou que contém um ácido nucléico codificando um polipeptídeo da invenção. De acordo com uma modalidade particularmente preferencial, as células hospedeiras referidas são células bacterianas, células de levedura, células fúngicas ou células de mamífero.

[00667] Células bacterianas adequadas incluem células de cepas bacterianas gram-negativas tais como cepas de *Escherichia coli*, *Proteus*, e *Pseudomonas*, e cepas bacterianas gram-positivas tais como cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, e *Lactococcus*. Células fúngicas adequadas incluem células de espécies de *Trichoderma*, *Neurospora*, e *Aspergillus*. Células de levedura adequadas incluem células de espécies de *Saccharomyces* (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por exemplo, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (por exemplo, *Pichia pastoris* e *Pichia methanolica*), e *Hansenula*.

[00668] Células de mamífero adequadas incluem por exemplo, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, células NS0, células HEK, e semelhantes. No entanto, também podem ser usadas células de anfíbios, células de insetos, células de plantas, e quaisquer outras células usadas na técnica para a expressão de proteínas heterólogas.

[00669] Para produção em escala industrial, hospedeiros heterólogos preferenciais para a produção (industrial) de polipeptídeos de domínio variável único de imunoglobulina e terapêuticos de proteína contendo os mesmos incluem cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris*, e *S. cerevisiae* que são adequadas para expressão, produção e fermentação em larga escala, e em particular para expressão (bio-)farmacêutica, produção e fermentação em larga escala.

[00670] A escolha do sistema de expressão específico vai depender em parte da necessidade de algumas modificações pós-translacionais, mais especificamente glicosilação. A produção de um polipeptídeo da invenção para o qual glicosilação é desejada ou requerida vai necessitar do uso de hospedeiros de expressão mamíferos que têm a capacidade de glicosilar a proteína expressada. A este respeito, será evidente para a pessoa versada que o padrão de glicosilação obtido (isto é, o tipo, número e posição de resíduos anexados) vai depender da célula

ou linhagem celular que é usada para a expressão.

[00671] Polipeptídeos da invenção produzidos em uma célula conforme estipulado acima podem ser produzidos quer intracelularmente (por exemplo, no citosol, no periplasma ou em corpos de inclusão) e em seguida isolados das células hospedeiras e opcionalmente adicionalmente purificados; ou podem ser produzidos extracelularmente (secretados no meio no qual as células hospedeiras são cultivadas) e em seguida isolados do meio de cultura e opcionalmente adicionalmente purificados.

[00672] Métodos e reagentes adicionais usados para a produção recombinante de polipeptídeos, tais como vetores de expressão adequados, métodos de transformação ou transfecção, marcadores de seleção, métodos de indução de expressão de proteínas, condições de cultura, e semelhantes, são conhecidos na técnica. De modo similar, técnicas de isolamento e purificação de proteínas úteis em um método de fabricação de um polipeptídeo da invenção são de conhecimento geral para a pessoa versada.

[00673] A produção dos polipeptídeos da invenção através de fermentação em organismos hospedeiros recombinantes convenientes tais como *E. coli* e levedura é rentável, em comparação com anticorpos convencionais os quais também requerem caras instalações de cultura de células de mamífero. Além disso, os níveis de expressão obteníveis são elevados e as produções dos polipeptídeos da invenção são na faixa de 1 a 10 g/l (*E. coli*) e até 10 g/l (levedura) e mais.

#### EXEMPLOS

[00674] *Produção de linhagens celulares CHO, Baf/3, Caki e HEK293 superexpressando CX3CR1 humana ou CX3CR1 de cynomolgus*

[00675] Células CHO e Baf/3 superexpressando CX3CR1 humana ou de cynomolgus foram geradas usando técnicas conhecidas na téc-

nica. Células expressando CCR2 ou CCR5 humanas também foram geradas usando técnicas conhecidas na técnica.

[00676] O cDNA foi clonado em pCDNA3.1(+)-neo para CX3CR1 humana ao passo que pcDNA-DEST40-neo foi usado para CX3CR1 de camundongo.

[00677] As sequências de aminoácidos de CX3CR1 humana e CX3CR1 de cynomolgus estão representadas em SEQ ID NO: 255 e 256, respectivamente.

[00678] De modo a estabelecer células de rim de camelo (Caki, Camel Kidney) superexpressando CX3CR1 humana ou CX3CR1 de camundongo, células Caki parentais foram eletroporadas com pCDNA3.1(+)-neo-hCX3CR1 ou pcDNA-DEST40-neo-mCX3CR1, respectivamente. Para todas as condições, os transfectantes foram selecionados adicionando 1 mg/mL de geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

[00679] Células de rim embrionário humano (HEK293, Human Embryonic Kidney) superexpressando CX3CR1 humana ou CX3CR1 de cynomolgus foram geradas por transfecção mediada por lipídeos com Fugene (Roche) de plasmídeos pCDNA3.1(+)-neo-hCX3CR1 ou cyCX3CR1, respectivamente, na linhagem celular parental HEK293. Estas células foram usadas como transfectantes transitórios e deste modo não foram postas sob seleção. Em resumo,  $2 \times 10^6$  células foram semeadas por T75 e incubadas de um dia para o outro antes de transfecção. Depois de remoção do meio de cultura, as células foram transfectadas com os plasmídeos respectivos (9  $\mu$ g) e Fugene (27  $\mu$ l) de acordo com as instruções do fabricante. 48 horas depois da transfecção, as células foram colhidas e congeladas para uso posterior.

## EXEMPLO 1: IMUNIZAÇÃO COM CX3CR1 INDUZ UMA REAÇÃO IMUNE HUMORAL EM LHAMA

### 1.1. Imunizações

[00680] Depois de aprovação pelo Comitê de Ética (University

Antwerp, Bélgica, UA2008A1, 2008/096, 2007/068), 9 lhamas (designados No. 368, 369, 370, 381, 382, 384, 312, 313 e 314) foram imunizados.

[00681] Seis lhamas (312, 313, 314, 381, 382 e 384) foram imunizados com 4 injeções intramusculares (2 mg/dose em intervalos semanais ou bisemanais) de vetor de plasmídeo pVAX1-huCX3CR1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Três lhamas (381, 382 e 384) em seguida receberam 4 injeções subcutâneas de CX3CR1 humana superexpressando células Caki as quais foram estabelecidas conforme descrito acima. As células foram ressuspensas em D-PBS e mantidas sobre gelo antes da injeção.

[00682] Três lhamas adicionais (designados No. 368, 369 e 370) foram imunizados de acordo com protocolos de rotina com 4 subcutâneas injeções de CX3CR1 humana superexpressando células Caki as quais foram estabelecidas conforme descrito acima. As células foram ressuspensas em D-PBS e mantidas sobre gelo antes da injeção. Em seguida, a estes lhamas foram administradas duas injeções com fragmento recombinante CX3CR1 NT/EC3 acoplado a BSA (TABELA 13). Os peptídeos foram ordenados no NeoMPS (*PolyPeptide Group*, Strasbourg, França) e acoplados a BSA de acordo com protocolos de rotina.

**TABELA 13 SEQUÊNCIA DE FRAGMENTOS DE PEPTÍDEO USADOS PARA REFORÇO DE IMUNIZAÇÃO**

Fragmento	sequência	SEQ ID NO:
CX3CR1-NT	Ac-Met-Asp-Gln-Phe-Pro-Glu-Ser-Val-Thr-Glu-Asn-Phe-Glu-Tyr-Asp-Asp-Leu-Ala-Glu-Ala-Cys-NH <sub>2</sub>	228
CX3CR1-EC3	Ac-Lys-Leu-Tyr-Asp-Phe-Phe-Pro-Ser-Cys-Asp-Met-Arg-Lys-Asp-Leu-Arg-Leu-NH <sub>2</sub>	229

[00683] A primeira injeção foi formulada em Adjuvante de Freund Completo (Difco, Detroit, MI, EUA), ao passo que a injeção subse-

quente foi formulada em Adjuvante de Freund Incompleto (Difco, Detroit, MI, eUA).

### **1.2. Avaliação de reações imunes induzidas em lhama**

[00684] De modo a avaliar a indução de reações imunes nos animais contra CX3CR1 humana por ELISA ou FACS, foram colhidos soros dos lhamas 312, 313 e 314 no dia 0 (pré-imune), e diferentes pontos do tempo no esquema de imunização (tempo de coleta de linfócitos do sangue periférico [PBL]).

[00685] Em resumo, Neutravidina (2 µg/mL) foi imobilizada de um dia para o outro a 4°C em uma placa Maxisorb de 96 cavidades (Nunc, Wiesbaden, Alemanha). As cavidades foram bloqueadas com uma solução de caseína (1%) em PBS. Em seguida fragmento NT recombinante biotilado (Polypeptide, Strasbourg, França) ou fragmentos EC3 biotilados de CX3CR1 (Polypeptide, Strasbourg, França) foram capturados a 2 µg/mL. Depois da adição de diluições séricas, imunoglobulinas ligadas especificamente foram detectadas usando uma imunoglobulina anti-lhama de cabra conjugada a peroxidase de raiz forte (HRP) (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, EUA) e uma reação enzimática subsequente na presença do substrato TMB One (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (Promega, Mannheim, Alemanha), mostrando que uma significativa reação imune dependente de anticorpos contra CX3CR1 foi induzida depois das imunizações com os peptídeos.

[00686] Adicionalmente, os títulos séricos de animais imunizados com células foram confirmados por análise FACS sobre CX3CR1 humana crescendo ativamente superexpressando células CHO. As respostas de títulos séricos de CX3CR1 para os lhamas 368, 369 e 370 foram determinadas com soro amostrado depois de 4 imunizações celulares (dia 49), 4 imunizações celulares e 1 reforço de peptídeo (dia 77) e 4 imunizações celulares e 2 reforços de peptídeo (dia 81). As células foram colhidas e lavadas antes de incubação com as diluições

séricas. Foi realizada detecção com IgG anti-lhama de cabra (Bethyl, Montgomery, TX, EUA) seguida por anti-cabra de burro acoplada com PE (Jackson Laboratories, Suffolk, Reino Unido) e leitura por análise em FACSArray (BD Biosciences). Um sumário das respostas séricas obtidas conforme determinado ou por ELISA ou por FACS é mostrado na TABELA 14 e na TABELA 15.

**TABELA 14 ANÁLISE DOS TÍTULOS SÉRICOS PARA OS ANIMAIS IMUNIZADOS COM CÉLULAS/PEPTÍDEOS**

Lhama	Imunogênio	ELISA		FACS	
		NT Recombinante	EC3 Recombinante	Depois de imunização celular	Depois de reforços de peptídeo
368	Caki-huCX3CR1 + peptídeo NT/EC3	+	+/-	-	-
369	Caki-huCX3CR1 + peptídeo NT/EC3	+	+/-	+	+
370	Caki-huCX3CR1 + peptídeo NT/EC3	++	++	-	+

**TABELA 15 ANÁLISE DOS TÍTULOS SÉRICOS PARA OS ANIMAIS IMUNIZADOS COM DNA/CÉLULAS**

Lhama	Imunogênio	ELISA		FACS	
		NT Recombinante	EC3 Recombinante	Depois de imunização com DNA	Depois de reforços celulares
381	DNA + Caki-huCX3CR1	++	+	++	++
382	DNA + Caki-huCX3CR1	+	-	-	-
384	DNA + Caki-huCX3CR1	++	-	-	-

[00687] Para os lhamas imunizados com DNA somente (312, 313 e 314) não foi determinado nenhum título sérico.

EXEMPLO 2: CLONAGEM DOS REPERTÓRIOS DE FRAGMENTOS DE ANTICORPO DE CADEIA PESADA SOMENTE E PREPARAÇÃO DE FAGO

[00688] Depois da injeção de imunogênio final de cada subgrupo, tecidos imunes como a fonte de células B que produzem os anticorpos de cadeia pesada foram coletados dos lhamas imunizados. Para os lhamas 312, 313 e 314, duas amostras de sangue de 150 mL, coletadas 4 e 8 dias depois da última injeção de antígeno foram coletadas por animal. Para os lhamas 368, 369 e 370 foram coletadas quatro amostras de sangue de 150 mL, 5 e 7 dias depois da última imunização celular e adicionalmente 4 e 8 dias depois da última imunização com peptídeo. Próximo a estas, foram colhidas duas biópsias de linfonodo, 12 dias depois da última imunização celular e 12 dias depois da última imunização com peptídeo. Para os lhamas 381, 382 e 384 foram coletadas cinco amostras de sangue de 150 mL, 8 dias depois da última imunização com DNA e adicionalmente 4 dias depois do primeiro reforço celular, 8 e 11 dias depois do segundo reforço celular e 8 dias depois da última imunização celular. Próximo a estas, foi colhida uma biópsia de linfonodo, 8 dias depois da segunda imunização celular.

[00689] A partir das amostras de sangue, linfócitos do sangue periférico (PBLs) foram preparados usando Ficoll-Hypaque de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). A partir dos PBLs e da biópsia de linfonodos (LN), foi extraído RNA total, o qual foi usado como material de partida para RT-PCR de modo a amplificar os segmentos de DNA codificando VHH.

[00690] Para cada lhama imunizado, foram construídas bibliotecas agrupando o RNA total isolado a partir das amostras originárias de um determinado subgrupo do esquema de imunização, isto é, depois de

um tipo de antígeno de imunização, e para alguns lhamas amostras dos diferentes animais foram reunidas em uma biblioteca (TABELA 16).

**TABELA 16 AGRUPAMENTO DAS DIFERENTES AMOSTRAS PARA CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS**

Nome da Biblioteca	Lhama	Amostra
368-PBL1+2+LN-V-100209	368	PBL 1 e 2, LN
369+370-PBL1+2+LN-V-100209	369, 370	PBL 1 e 2, LN
368-PBL3+4-V-280909	368	PBL 3 e 4
369-PBL3+4-V-070409	369	PBL 3 e 4
370-PBL3+4-V-070409	370	PBL 3 e 4
381-PBL1-V-180310	381	PBL 1
382-PBL1-V-180310	382	PBL1
384-PBL1-V-180310	384	PBL1
381-PBL1+2+3+4+5+LN-V-280909	381	PBL 1, 2, 3, 4, 5 e LN
382-PBL1+2+3+4+5+LN-V-280909	382	PBL 1, 2, 3, 4, 5 e LN
384-PBL1+2+3+4+5+Ln-V-280909	384	PBL 1, 2, 3, 4, 5 e LN
312+313+314-PBL1+2-V-220210	312, 313 e 314	PBL 1 e 2
312-PBL1+2-V-180310	312	PBL 1 e 2
313-PBL1+2-V-180310	313	PBL 1 e 2
314-PBL1+2-V-180310	314	PBL 1 e 2

[00691] Em resumo, o repertório de VHH amplificado por PCR foi clonado através de sítios de restrição específicos em um vetor designado para facilitar o display de fago da biblioteca de VHH. O vetor foi derivado de pUC119 e contém o promotor LacZ, uma sequência codificante de proteína M13 fago gIII, um gene de resistência para ampicilina ou carbenicilina, um sítio de clonagem múltipla e uma sequência líder híbrida gIII-peIB (pAX050). In frame com a sequência codificante de VHH, o vetor codifica uma etiqueta c-myc C-terminal e uma etiqueta His6. Os fagos foram preparados de acordo com protocolos de rotina e armazenados depois de esterilização por filtro a 4°C ou a -80°C em 20% de glicerol para utilização posterior.

### EXEMPLO 3: SELEÇÃO DE VHHS ESPECÍFICOS PARA CX3CR1 ATRAVÉS DE DISPLAY DE FAGO

[00692] Repertórios de VHH obtidos a partir de todos os lhamas e clonados como biblioteca de fagos foram usados em diferentes estratégias de seleção, aplicando uma multiplicidade de condições de seleção. Variáveis incluem i) a forma de apresentação da proteína CX3CR1 (sobre diferentes fundos celulares ou sobre lipossomas/VLPs), ii) o método de apresentação de antígeno (Em solução ao usar células ou revestido sobre placas ao usar VLPs), iii) a concentração de antígeno iv) o ortólogo usado (humano ou cynomolgus) v) o número de rodadas de seleção e vi) métodos de elutriação diferentes (inespecíficos através de tripsina ou específicos através do ligante Fractalcina). Todas as seleções de fase sólida revestida foram feitas em placas Maxisorp de 96 cavidades (Nunc, Wiesbaden, Alemanha).

[00693] As seleções foram realizadas como se segue: preparações de antígeno CX3CR1 para formatos de seleção de fase sólida e de solução foram apresentadas conforme descrito acima em múltiplas concentrações. Depois de 2 horas de incubação com as bibliotecas de fagos seguidas por extensiva lavagem, os fagos ligados foram elutriados com tripsina (1 mg/mL) por 15 minutos. Quando tripsina foi usada para elutriação de fago, a atividade de protease foi imediatamente neutralizada aplicando 0,8 mM de inibidor de protease ABSF. Como controle, seleções sem antígeno foram realizadas em paralelo.

[00694] As produções de fagos foram usadas para infectar *E. coli* as quais foram em seguida por sua vez usadas para preparar fago para a próxima rodada de seleção (resgate de fago). Depois da segunda rodada de seleção, as produções de fagos foram usadas para infectar *E. coli* as quais foram em seguida laminadas sobre placas de agar (LB+carb+glicose<sup>2%</sup>) para análise de clones de VHH individuais. De modo a triar uma produção de seleção para ligantes específicos, colô-

nias únicas foram selecionadas entre as placas de agar e cultivadas em 1 mL de placas de 96 cavidades profundas. A expressão de VHH controlada por LacZ foi induzida adicionando IPTG (1 mM final) na ausência de glicose. Extratos periplasmáticos (em um volume de ~ 80 uL) foram preparados de acordo com protocolos de rotina.

#### EXEMPLO 4: TRIAGEM DE EXTRATOS PERIPLASMÁTICOS EM TESTE FACS DE COMPETIÇÃO CX3CR1-FRACTALKINA

[00695] Extratos periplasmáticos foram triados em um teste de competição FACS CX3CR1 humana/Fractalcina humana de modo a avaliar a capacidade de bloqueio dos VHHs expressados. CX3CR1 humana estava presente sobre células CHO superexpressando CX3CR1. Foi usada tanto uma configuração usando células colhidas a partir de uma cultura crescendo ativamente quanto uma configuração usando células congeladas. Como um reagente de detecção foi usada fractalcina etiquetada (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) etiquetada com alexa647 (A647-Fractalcina) em um grau de marcação de 1. De modo a configurar o teste, primeiro foi realizada uma série de titulações da fractalcina etiquetada sobre as células CHO-huCX3CR1 de modo a determinar o valor da EC50 para ligação. Inicialmente foi realizada triagem em uma maior concentração de fractalcina (3 nM) de modo a aumentar a robustez do teste. De modo a aumentar a sensibilidade da triagem a um máximo, a concentração a EC30 (1 nM) foi escolhido para triagem subsequente. Em resumo, 50 µl de extrato periplasmático foi adicionado a 6 nM de fractalcina etiquetada (50 µl) e 200 000 células CHO-huCX3CR1. Depois de uma hora de incubação a 4 C, as células foram lavadas três vezes antes de ser realizada a leitura em um FACS Array (Becton Dickinson). Primeiro uma barreira (*gate*) foi definida sobre as células intactas conforme determinado a partir do perfil de difusão. Em seguida, as células mortas foram excluídas (*gated out*) por seu perfil de fluorescência a partir da cepa PI (Sigma,

St Louis, EU). O perfil de fluorescência da etiqueta alexa647 foi determinado para cada amostra e foi usado para cálculo da capacidade de bloqueio. Como controles, as condições foram tomadas junto onde não havia nenhum VHH presente no peri extrato ou um VHH irrelevante conhecido e amostras foram incluídos onde o excesso de fractalcina a frio foi incluído. Para cada amostra a percentagem de bloqueio foi determinada usando as amostras de controle para determinar a janela de teste.

[00696] A partir desta triagem, VHHs foram selecionados e análise de sequências revelou 120 VHHs únicos pertencentes a 3 diferentes linhagens de células B. O número total de variantes encontradas para cada linhagem de células B é representado na TABELA 17.

**TABELA 17 PARÂMETROS DE SELEÇÃO USADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE CÉLULAS B DE VHH ESPECÍFICOS DE CX3CR1 HUMANA**

Linhagem de células B	Típico VHH ID	no. de variantes	bibliotecas
9	CX3CR1BII11H11	4	368-PBL1+2+LN-V-100209
13	CX3CR1BII18E06	68	368-PBL1+2+LN-V-100209 368-PBL3+4-V-280909
101	CX3CR1BII66B02	48	312+313+314-PBL1+2-V-220210 314-PBL1+2-V-180310

[00697] Uma visão geral do procedimento de seleção e da performance durante triagem inicial é dada para todos os VHHs na Tabela 18.

**TABELA 18 CONDIÇÕES DE SELEÇÃO E RESULTADO DA TRIAGEM PRIMÁRIA PARA O VHH ESPECÍFICO PARA HUCX3CR1**

VHH ID	Família	Biblioteca	Seleções				% de bloqueio
			primeira rodada		segunda rodada		
CX3CR1B IIPMP11H 11	9	368- PBL1+2+L N-V- 100209	BA/F3_h CX3CR1	total (tripsina)	CHO- K1_hCX3 CR1	total (tripsina)	99,0

VHH ID	Família	Biblioteca	Seleções				% de bloqueio
			primeira rodada		segunda rodada		
CX3CR1B IIPMP18E 6	13	368- PBL3+4- V-280909	BA/F3_h CX3CR1	total (tripsina)	CHO- K1_hCX3 CR1	total (tripsina)	53,1
CX3CR1B IIPMP54A 12	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	93,8
CX3CR1B IIPMP54A 3	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	90,8
CX3CR1B IIPMP54A 4	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	86,6
CX3CR1B IIPMP54A 5	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	92,5
CX3CR1B IIPMP54A 7	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	total (tripsina)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	total (tripsina)	68,9
CX3CR1B IIPMP54B 1	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	92,1
CX3CR1B IIPMP54B 2	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	65,3
CX3CR1B IIPMP54B 3	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	90,1
CX3CR1B IIPMP54B 5	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	92,6

VHH ID	Família	Biblioteca	Seleções				% de bloqueio
			primeira rodada		segunda rodada		
CX3CR1B IIPMP54D 5	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	87,8
CX3CR1B IIPMP54D 8	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	total (tripsina)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	total (tripsina)	64,1
CX3CR1B IIPMP54F 6	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	96,6
CX3CR1B IIPMP54G 3	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	74,7
CX3CR1B IIPMP54H 1	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	74,6
CX3CR1B IIPMP54H 4	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	96,0
CX3CR1B IIPMP61F 10	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	73,5
CX3CR1B IIPMP61D 1	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	68,4
CX3CR1B IIPMP61D 5	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	94,9
CX3CR1B IIPMP61E 2	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	70,3
CX3CR1B IIPMP61F 11	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	96,5

VHH ID	Família	Biblioteca	Seleções				% de bloqueio
			primeira rodada		segunda rodada		
CX3CR1B IIPMP61G 2	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	82,0
CX3CR1B IIPMP61G 3	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	92,1
CX3CR1B IIPMP61G 4	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	94,5
CX3CR1B IIPMP61F 4	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	94,4
CX3CR1B IIPMP61A 11	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	78,0
CX3CR1B IIPMP61B 2	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	94,5
CX3CR1B IIPMP61C 9	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	total (tripsina)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	total (tripsina)	69,4
CX3CR1B IIPMP65H 02	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A
CX3CR1B IIPMP65E 11	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A
CX3CR1B IIPMP65E 10	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A
CX3CR1B IIPMP65E 05	101	312+313+ 314- PBL1+2- V-220210	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A
CX3CR1B IIPMP65B	101	312+313+ 314-	VLPs- hCX3CR	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1	hFrac (2 µM)	#N/A

VHH ID	Família	Biblioteca	Seleções				% de bloqueio
			primeira rodada		segunda rodada		
11		PBL1+2-V-220210	1 (10U)		(10U)		
CX3CR1B IIPMP65B 07	101	312+313+314-PBL1+2-V-220210	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A
CX3CR1B IIPMP65B 09	101	312+313+314-PBL1+2-V-220210	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A
CX3CR1B IIPMP65H 01	101	312+313+314-PBL1+2-V-220210	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A
CX3CR1B IIPMP65G 07	101	312+313+314-PBL1+2-V-220210	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66H 08	101	314-PBL1+2-V-180310	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66H 04	101	314-PBL1+2-V-180310	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66F 02	101	314-PBL1+2-V-180310	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66E 11	101	314-PBL1+2-V-180310	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66D 10	101	314-PBL1+2-V-180310	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66D 08	101	314-PBL1+2-V-180310	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	VLPs-hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 $\mu$ M)	#N/A

VHH ID	Família	Biblioteca	Seleções				% de bloqueio
			primeira rodada		segunda rodada		
CX3CR1B IIPMP66B 02	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66A 04	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66D 04	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66D 02	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66D 06	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A
CX3CR1B IIPMP66G 01	101	314- PBL1+2- V-180310	VLPs- hCX3CR 1 (10U)	hFrac (2 µM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 µM)	#N/A

[00698] As sequências de aminoácidos de todos os VHHs únicos obtidos são mostradas na Listagem de Sequências e acima (foram indicadas CDRs e regiões de framework).

#### EXEMPLO 5: CARACTERIZAÇÃO DE VHHS PURIFICADOS

[00699] VHHs anti-CX3CR1 inibidores selecionados a partir da triagem descrita no Exemplo 4 foram adicionalmente purificados e caracterizados. VHHs selecionados foram expressados em *E. coli* TG1 como proteínas com etiqueta c-myc, His6. Foi induzida expressão por adição de 1 mM de IPTG e deixada para continuar por 4 horas a 37°C. Depois de cextrifugar as culturas celulares, foram preparados extratos periplasmáticos por congelamento-descongelamento dos péletes. Estes extratos foram usados como material de partida e VHHs foram purificados através de IMAC e cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) resultando em 95% de pureza conforme avaliado através de SDS-PAGE.

**Inibição por VHHs anti-CX3CR1 de ligação de Fractalcina humana à CX3CR1 humana expressada sobre células BA/F3**

[00700] A capacidade de bloqueio para o ligante fractalcina dos VHHs foi avaliada em um FACS de competição de CX3CR1 humana conforme resumido no Exemplo 4. Foram usadas ou células CHO-huCX3CR1, células BA/F3-huCX3CR1 ou células HEK293T transfectadas transitoriamente. A quantidade de ligante marcado usado nas diferentes configurações de competição também foi variada. Os valores da IC<sub>50</sub> para VHHs bloqueando a interação de fractalcina humana com CX3CR1 humana são representados na TABELA 19.

**TABELA 19 POTÊNCIA E EFICÁCIA DO VHH EM UM FACS DE COMPETIÇÃO DE LIGANTE**

ID do VHH	Família	Linhagem celular	IC50	% de bloqueio	Repetições
11H11	9	CHO-huCX3CR1	1.7 E-8	100	4
18E06	13	CHO-huCX3CR1	1.8 E-9	33	4
54A12	101	CHO-huCX3CR1	2.1 E-9	104	2
54D08	101	CHO-huCX3CR1	1.5 E-8	101	2
54A07	101	CHO-huCX3CR1	1.1 E-8	78	2
54D05	101	CHO-huCX3CR1	2.7 E-9	102	2
54B03	101	CHO-huCX3CR1	2.5 E-8	108	1
54G03	101	CHO-huCX3CR1	5.6 E-8	107	1
11H11	9	BA/F3-huCX3CR1	8.1 E-9	100	3
18E06	13	BA/F3-huCX3CR1	2.8 E-9	71	3
54A12	101	BA/F3-huCX3CR1	4.0 E-9	100	4
54D08	101	BA/F3-huCX3CR1	3.8 E-8	99	1
54A07	101	BA/F3-huCX3CR1	1.5 E-8	81	4
54D05	101	BA/F3-huCX3CR1	5.5 E-9	99	1
54B03	101	BA/F3-huCX3CR1	3.3 E-8	99	1
54G03	101	BA/F3-huCX3CR1	9.8 E-8	98	1
54A12	101	HEK293-huCX3CR1	6.8 E-9	96	5
54D08	101	HEK293-huCX3CR1	8.4 E-8	95	2

ID do VHH	Família	Linhagem celular	IC50	% de bloqueio	Repetições
54A07	101	HEK293-huCX3CR1	2.3 E-8	52	2
54D05	101	HEK293-huCX3CR1	5.3 E-9	94	5
54B03	101	HEK293-huCX3CR1	6.7 E-8	92	2
54G03	101	HEK293-huCX3CR1	2.7E-7	89	2
61E02	101	HEK293-huCX3CR1	8.2 E-8	98	2
61B04	101	HEK293-huCX3CR1	5.7 E-8	97	2
61B02	101	HEK293-huCX3CR1	1.0 E-8	94	2
54H01	101	HEK293-huCX3CR1	1.0 E-8	64	2
54A04	101	HEK293-huCX3CR1	4.9 E-8	100	2
61F11	101	HEK293-huCX3CR1	4.6 E-8	96	2
61G03	101	HEK293-huCX3CR1	6.0 E-8	96	2
61G04	101	HEK293-huCX3CR1	4.2 E-8	96	2
66B02	101	HEK293-huCX3CR1	2.5 E-9	102	2
66G01	101	HEK293-huCX3CR1	1.4 E-8	99	2

**Inibição por VHHs anti-CX3CR1 de quimiotaxia, induzida por Fractalcina humana, de células BA/F3 superexpressando CX3CR1 humana**

[00701] De modo a avaliar a inibição de quimiotaxia induzida por Fractalcina, um teste de quimiotaxia foi configurado usando a câmara descartável ChemoTx com tamanho de poro de 5 µm (Neuroprobe, Gaithersburg, EU). As células foram colhidas a partir de uma cultura crescendo ativamente e foram lavadas antes do uso em meio de teste, RPMI (Gibco, Carlsbad, EU) suplementado com 0,1% de BSA. A câmara de fundo foi preenchida com 320 pM de Fractalcina humana em um volume total de 300 µl. Depois de aplicação da membrana, 0.13E6 células foram depositadas na parte superior da membrana em um volume total de 70 µl. Quimiotaxia foi permitida por 3 horas a 37°C em uma câmara umidificada com CO<sub>2</sub>. Depois deste período de incubação, a membrana foi removida e as células na câmara de fundo foram ressuspensas. A quantidade de ATP presente nas cavidades foi de-

terminada usando o kit CellTiter-Glo (Promega, Madison WI, EU). Foi realizada leitura em um Envision (Perkin Elmer, Massachusetts, EU) com as configurações de rotina para leitura da luminescência. Séries de titulações foram realizadas em triplicata e cada placa continha amostras de controle também em triplicata. Como controle, foi incluída uma amostra sem VHH bem como uma amostra onde não foi adicionada nenhuma Fractalcina humana à câmara de fundo. Um sumário dos resultados é mostrado na TABELA 20.

**TABELA 20 POTÊNCIA E EFICÁCIA DO VHH EM BLOQUEIO DA QUIMIOTAXIA INDUZIDA PELA FRACTALCINA**

VHH ID	Família	IC50	% de bloqueio	Repetições
11H11	9	2 E-7	89	5
18E06	13	NA	17	4
54A12	101	8 E-8	84	6
54D08	101	NA	33	2
54A07	101	5 E-8	45	4
54D05	101	7 E-8	81	4
54B03	101	1 E-7	73	1
54G03	101	NA	40	1
66B02	101	2 E-8	87	2
66G01	101	4 E-7	54	2

**Avaliação da reatividade cruzada dos VHHs anti-CX3CR1 contra CX3CR1 de cynomolgus**

[00702] Inicialmente, uma configuração de ligação à base de FACS foi usada para avaliar a reatividade cruzada com cynomolgus. Para isto, os VHHs foram incubados com as células respectivas por 30 minutos a 4°C seguido por três etapas de lavagem e subsequentemente incubados com os reagentes de detecção. Como detecção, foi usado um anticorpo anti-cmyc de camundongo (Serotec, MCA2200) seguido por um anticorpo anti-camundongo de cabra acoplado a PE (Jackson

115-116-071), cadaincubação por 30 minutos a 4°C, seguida por três etapas de lavagem. Os resultados do teste são mostrados na TABELA 21.

**TABELA 21 VALOR DA EC50 PARA LIGAÇÃO DO VHH RESPECTIVO SOBRE CX3CR1 HUMANA OU SOBRE CX3CR1 DE CYNOMOLGUS**

ID do VHH	Família	EC50 (M) Human	EC50 (M) Cynomolgus	proporção	Repetições
11H11	9	8,0 E-10	NA	NA	2
18E06	13	1,5 E-9	1,4 E-8	9	2
54A12	101	3,5 E-8	1,1 E-7	3.3	1
54A07	101	5,4 E-7	3,0 E-8	0.1	1
54D05	101	8,4 E-10	5,0 E-8	59.6	1

[00703] Para VHHs identificados posteriormente, um FACS de competição de Fractalcina humana foi configurado usando CX3CR1 humana ou de cynomolgus expressada em células HEK293T. Tanto o receptor humano quanto o receptor de cynomolgus foram transfectados de modo transitório em células HEK293T e as transfecções foram combinadas pela ligação do ligante etiquetado, fractalcina humana. A competição foi avaliada usando a concentração EC30 de fractalcina e deste modo os valores da IC50 obtidos são uma boa estimativa do valor  $K_i$ , uma medida para afinidade (TABELA 22). O experimento foi realizado conforme descrito no Exemplo 4. A proporção dos valores da IC50 em CX3CR1 de macaco cynomolgus e humana foi usada para avaliar potenciais diferenças na afinidade por CX3CR1 em ambas as espécies.

**TABELA 22 EFICÁCIA E POTÊNCIA DE VHHS EM FACS DE COMPETIÇÃO DE LIGANTE PARA CX3CR1 HUMANA E DE CYNOMOLGUS**

ID do VHH	Família	Humana		Cynomolgus		proporção	Repetições
		IC50 (M)	% de bloqueio	IC50 (M)	% de bloqueio		
54A12	101	6,8 E-9	96	6,7 E-8	94	9,85	5
54D08	101	8,4 E-8	95	7,2 E-8	91	0,85	2
54A07	101	2,3 E-8	52	2,8 E-7	69	12,3	2
54D05	101	5,3 E-9	94	6,4 E-8	91	12,25	5
54B03	101	6,7 E-8	92	4,7 E-7	95	7,05	2
54G03	101	2,7E-7	89	4,7 E-7	89	1,74	2
61E02	101	8,2 E-8	98	4,6 E-8	96	0,55	2
61B04	101	5,7 E-8	97	8,7 E-8	93	1,53	2
61B02	101	1,0 E-8	94	4,5 E-8	92	4,37	2
54H01	101	1,0 E-8	64	6,8 E-8	92	6,48	2
54A04	101	4,9 E-8	100	3,1 E-8	91	0,64	2
61F11	101	4,6 E-8	96	1,6 E-7	95	3,58	2
61G03	101	6,0 E-8	96	3,0 E-7	89	5,02	2
61G04	101	4,2 E-8	96	2,0 E-7	100	4,8	2
66B02	101	2,5 E-9	102	1,9 E-8	97	7,5	2
66G01	101	1,4 E-8	99	1,2 E-7	100	8,29	2

**Ligações dos VHHs anti-CX3CR1 humana a CCR2 humana, CCR5 humana ou CX3CR1 de camundongo**

[00704] A especificidade para o receptor de huCX3CR1 foi avaliada realizando um experimento de ligação FACS sobre células parentais CHO-K1 ou células CHO expressando huCCR2, huCCR5 ou msCX3CR1. Os VHHs foram incubados com as respectivas linhagens celulares por 30 minutos a 4°C seguido por três etapas de lavagem e em seguida foram incubados com os reagentes de detecção. Como detecção, foi usado um anticorpo anti-cmyc de camundongo (Serotec, MCA2200) seguido por um anticorpo anti-camundongo de cabra acoplado a PE (Jackson 115-116-071), cada incubação por 30 minutos a 4°C, seguida por três etapas de lavagem. Para cada linhagem celular foi incluído um controle de qualidade com anticorpo receptor-específico. Além disso, a maior concentração de cada VHH também foi incubada com células CHO expressando huCX3CR1 como um controle positivo. Não pode ser observada ligação a msCX3CR1, huCCR2 ou

huCCR5.

### **Determinação do epítoto bin**

[00705] Um experimento de ligação competitiva foi configurado de modo a determinar se os VHHs ligam epítotoes em sobreposição sobre CX3CR1. Para isto, foi usado o VHH 66B02 marcado com alexa647 em um FACS de competição sobre as células BA/F3 expressando huCX3CR1. VHHs típicos das três famílias funcionais foram usados como competidores para a ligação do 66B02 marcado. Os valores IC50 obtidos são mostrados na TABELA 23.

**TABELA 23 BINNING DE EPÍTOPE À BASE DE FACS DE COMPETIÇÃO**

ID do VHH	família	IC50 (M)	% de bloqueio
11H11	9	4.9E-09	100
18E06	13	2.3E-09	100
66B02	101	1.5E-09	100

[00706] Como uma inibição completa de ligação de 66B02 pode ser obtida por todos os VHHs típicos das diferentes famílias de bloqueio de ligante, pode ser concluído que todas as famílias funcionais ligam em proximidade suficientemente estreita umas das outras de tal modo que competem com a ligação de 66B02.

### **EXEMPLO 6: FORMATAÇÃO DE VHHS PARA BIVALÊNCIA**

#### **Construção de bivalentes**

[00707] De modo a aumentar a potência e/ou a eficácia de uma seleção dos VHHs obtidos, moléculas bivalentes foram construídas por engenharia genética. Dois VHHs foram geneticamente ligados junto com um encadeador de 35GS entre os dois blocos de construção e subsequentemente expressados em *E.coli* conforme descrito acima para os VHHs monovalentes. Diferentes constructos bivalentes foram produzidos conforme listado na TABELA 24.

**TABELA 24 FORMATOS BIVALENTES TÍPICOS**

ID do Constructo	Identidade do VHH	Família	Encadeador	Identidade do VHH	Família
CX3CR1BII007	CX3CR1BII11H11	9	35GS	CX3CR1BII18E6	13
CX3CR1BII009	CX3CR1BII18E6	13	35GS	CX3CR1BII11H11	9
CX3CR1BII012	CX3CR1BII54D08	101	35GS	CX3CR1BII18E06	101
CX3CR1BII016	CX3CR1BII54A12	101	35GS	CX3CR1BII54A12	101
CX3CR1BII017	CX3CR1BII54D5	101	35GS	CX3CR1BII54D5	101
CX3CR1BII018	CX3CR1BII66B02	101	35GS	CX3CR1BII66B02	101
CX3CR1BII019	CX3CR1BII66G01	101	35GS	CX3CR1BII66G01	101
CX3CR1BII020	CX3CR1BII54B5	101	35GS	CX3CR1BII54B5	101
CX3CR1BII026	CX3CR1BII11H11	9	35GS	CX3CR1BII66B02	101
CX3CR1BII027	CX3CR1BII11H11	9	35GS	CX3CR1BII54B5	101

**Inibição por VHHs anti-CX3CR1 da ligação de Fractalcina humana a CX3CR1 humana expressada sobre as células BA/F3**

[00708] A inibição da oligação de ligante a CX3CR1 humana foi investigada para os diferentes formatos conforme descrito no Exemplo 4. Para esta caracterização foi usada a linhagem celular BA/F3-huCX3CR1 apresentando expressão estável do receptor de CX3CR1 humana. O ligante fractalcina marcado com alexa647 foi usado em sua concentração EC30 e deste modo os valores IC50 obtidos são reflexo dos valores Ki. Uma visão geral dos dados obtidos é mostrada na tabela 25.

**TABELA 25 POTÊNCIA DE FORMATOS BIVALENTES EM COMPE- TIÇÃO DE LIGANTE**

ID do Constructo	Linhagem celular	IC50 (M)	% de bloqueio	Repetições
CX3CR1BII007	CHO-huCX3CR1	3.8 E-10	100	2
CX3CR1BII009	CHO-huCX3CR1	7.0 E-10	91	2
CX3CR1BII012	CHO-huCX3CR1	8.0 E-10	93	1
CX3CR1BII016	HEK293-huCX3CR1	1.9 E-10	102	2
CX3CR1BII017	HEK293-huCX3CR1	3.1 E-10	99	2
CX3CR1BII018	HEK293-huCX3CR1	3.0 E-10	102	2
CX3CR1BII019	HEK293-huCX3CR1	2.9 E-10	100	2
CX3CR1BII020	HEK293-huCX3CR1	2.2 E-10	102	2
CX3CR1BII026	BA/F3-huCX3CR1	7.0 E-10	100	3
CX3CR1BII027	BA/F3-huCX3CR1	6.7 E-10	100	3

**Inibição por VHHs anti-CX3CR1 da quimiotaxia, induzida por Fractalina humana, de células BA/F3 superexpressando CX3CR1 humana**

[00709] Similar ao que foi descrito para os VHHs monovalentes anti-CX3CR1, a inibição de quimiotaxia induzida pela fractalina sobre as células BA/F3-huCX3CR1 foi avaliada para os constructos bivalentes. Foi usada uma configuração de teste idêntica conforme descrito acima e os resultados obtidos estão resumidos na tabela 26.

**TABELA 26 INIBIÇÃO DE QUIMIOTAXIA INDUZIDA PELA FRAC-TALCINA POR CONSTRUCTOS DE VHH BIVALENTES**

ID do Construc-to	Linhagem celular	IC50 (M)	% de blo-queio	Repeti-ções
CX3CR1BII007	BA/F3-huCX3CR1	4 E-9	101	5
CX3CR1BII009	BA/F3-huCX3CR1	2 E-8	79	5
CX3CR1BII012	BA/F3-huCX3CR1	4 E-9	78	1
CX3CR1BII016	BA/F3-huCX3CR1	2 E-9	88	3
CX3CR1BII017	BA/F3-huCX3CR1	3 E-9	89	3
CX3CR1BII018	BA/F3-huCX3CR1	6 E-10	98	6
CX3CR1BII019	BA/F3-huCX3CR1	2 E-9	85	3
CX3CR1BII020	BA/F3-huCX3CR1	2 E-9	85	3

CX3CR1BII026	BA/F3-huCX3CR1	3 E-10	98	1
CX3CR1BII027	BA/F3-huCX3CR1	9 E-10	98	1

**Avaliação da reatividade cruzada dos VHHs anti-CX3CR1 contra CX3CR1 de cynomolgus**

[00710] Também para os constructos bivalentes a reatividade cruzada para CX3CR1 de cynomolgus foi avaliada e comparada com a reatividade humana. Conforme descrito anteriormente, ou uma configuração de ligação (Tabela 27) ou uma configuração de competição de ligante (TABELA 28) foram aplicadas usando células HEK293T transfectadas de modo transitório. Lotes de células transfectadas de modo transitório foram combinados por seu nível de expressão de receptor.

**TABELA 27 LIGAÇÃO DE CONSTRUCTOS BIVALENTES A CX3CR1 HUMANA OU DE CYNOMOLGUS**

ID dp Constructo	Linhagem celular	EC50 (M) Humana	EC50 (M) Cynomolgus	proporção	Repetições
CX3CR1BII007	HEK293T	3,1 E-10	4,8 E-8	154	2
CX3CR1BII009	HEK293T	2,0 E-9	6,8 E-9	3,3	2
CX3CR1BII012	HEK293T	5,6 E-11	6,3 E-11	1,1	1

**TABELA 28 COMPETIÇÃO DE LIGANTE DE CONSTRUCTOS BIVALENTES SOBRE CX3CR1 HUMANA OU DE CYNOMOLGUS**

ID do Constructo	Linhagem celular	Humana		Cynomolgus		proporção	Repetições
		IC50 (M)	% de bloqueio	IC50 (M)	% de bloqueio		
CX3CR1BII016	HEK293T	1,9 E-10	102	6,9 E-10	98	3,67	2
CX3CR1BII017	HEK293T	3,1 E-10	99	1,6 E-9	95	5,34	2
CX3CR1BII018	HEK293T	3,0 E-11	102	1,0 E-10	97	3,33	2
CX3CR1BII019	HEK293T	2,9 E-10	100	8,2 E-10	96	2,86	2
CX3CR1BII020	HEK293T	2,2 E-10	102	3,2 E-10	97	1,47	2

**EXEMPLO 7: EXPLORAÇÃO DO COMPRIMENTO DO ENCADEADOR E EXTENSÃO DA MEIA VIDA**

**Avaliação do comprimento do encadeador e posicionamento do VHH alb11**

[00711] Como o comprimento do encadeador usado em um formato bivalente pode impactar drasticamente sobre a potência obtida, foram avaliados diferentes comprimentos de encadeador.

[00712] Além disso, Alb11, um Nanobody ligando a albumina sérica humana foi incluído de modo a aumentar a meia-vida in vivo das moléculas formatadas (publicação de patente internacional No. WO 06/122787). Foram produzidos diferentes formatos incluindo variações sobre os comprimentos do encadeador usado, mas também o posicionamento dos diferentes VHHs da composição. Um sumário dos formatos explorados é mostrado na TABELA 29.

**TABELA 29 EXPLORAÇÃO DA EXTENSÃO DA MEIA-VIDA E DO COMPRIMENTO DO ENCADEADOR**

ID do Constructo	Identidade do VHH	Enca-deador	Identidade do VHH	Enca-deador	Identidade do VHH
CX3CR1BII032	CX3CR1BII66B02	9GS	CX3CR1BII66B02	9GS	Alb11
CX3CR1BII034	CX3CR1BII66B02	35GS	CX3CR1BII66B02	9GS	Alb11
CX3CR1BII036	CX3CR1BII66B02	9GS	Alb11	9GS	CX3CR1BII66B02
CX3CR1BII040	CX3CR1BII66B02	9GS	CX3CR1BII66B02	35GS	Alb11
CX3CR1BII041	CX3CR1BII66B02	35GS	CX3CR1BII66B02	35GS	Alb11
CX3CR1BII042	CX3CR1BII66B02	35GS	Alb11	35GS	CX3CR1BII66B02

[00713] Sequências codificantes para o VHH formatado foram clonadas em um plasmídeo construído internamente (*in-house*) permitindo expressão em *Pichia pastoris* e secreção no meio de cultura. O vetor de expressão foi derivado de pPICZa (Invitrogen) e continha o promotor AOX1 para expressão induzida por metanol, fortemente regulada, um gene de resistência para Zeocin™, um sítio de multiclonagem e

o sinal de secreção do fator  $\alpha$ . Depois de transformação, culturas de expressão foram cultivadas e a expressão de VHH foi induzida por adição de metanol e deixada para continuar por 48 horas a 30°C.

[00714] A potência destes diferentes formatos foi avaliada usando o teste de competição de ligante conforme descrito acima. Vendo que a concentração de ligante usada é abaixo do valor da EC50, os valores da IC50 obtidos são equivalentes aos valores Ki. O Ki obtido para os diferentes formatos está resumido na Tabela 30.

**TABELA 30 POTÊNCIA DE FORMATOS DE MEIA-VIDA ESTENDIDA EM COMPETIÇÃO DE LIGANTE**

ID do Constructo	Linhagem celular	IC50 (M)	% de bloqueio	Repetições
CX3CR1BII032	BA/F3-huCX3CR1	5,8 E-10	99	2
CX3CR1BII034	BA/F3-huCX3CR1	5,2 E-10	99	2
CX3CR1BII036	BA/F3-huCX3CR1	5,6 E-10	99	2
CX3CR1BII040	BA/F3-huCX3CR1	5,9 E-10	104	1
CX3CR1BII041	BA/F3-huCX3CR1	6,4 E-10	102	1
CX3CR1BII042	BA/F3-huCX3CR1	8,9 E-10	100	1

**Impacto da albumina sérica humana sobre a potência**

[00715] A ligação de albumina sérica humana (HSA) ao alb11 VHH pode impactar sobre a potência do formato e portanto a competição de ligante foi repetida na presença de HSA. Em resumo, de modo a permitir a ligação de HSA ao alb11 VHH, os constructos sob avaliação e fractalcina foram pré-incubados com HSA por 30 minutos antes de adição às células. Além disso as células foram ressuspensas em tampão FACS suplementado com HSA. A concentração final de HSA usada foi um excesso de 50 vezes acima da maior concentração de VHH usada. Em seguida, a competição foi permitida por 2 horas e o processamento posterior foi conforme descrito no Exemplo 4.

ID do Constructo	Linhagem celular	IC50 (M)	% de bloqueio	Repetições
CX3CR1BII032	BA/F3-huCX3CR1	1,4 E-9	100	2

ID do Constructo	Linhagem celular	IC50 (M)	% de bloqueio	Repetições
CX3CR1BII034	BA/F3-huCX3CR1	1,3 E-9	100	2
CX3CR1BII036	BA/F3-huCX3CR1	1,4 E-9	100	2

[00716] A potencial interferência da HSA também foi avaliada em uma configuração de quimiotaxia adaptada, incluindo HSA nos diferentes compartimentos do teste. A concentração de HSA usada foi novamente um excesso de 50 vezes em relação à maior concentração de constructo usada e os constructos foram carregados com HSA por 30 minutos antes do início do teste. O tampão de teste também foi suplementado com HSA de tal modo que HSA está presente durante toda a extensão do experimento. Conforme descrito acima, foi usada a câmara descartável ChemoTx com tamanho de poro de 5 µm (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, EUA). As células foram colhidas a partir de uma cultura crescendo ativamente e foram lavadas antes do uso em meio de teste, RPMI (Gibco, Carlsbad, EU) suplementado com 0,1% de BSA e 62,5 µM de HSA (Sigma, A8763). A câmara de fundo foi preenchida com 320 pM de Fractalcina humana em um volume total de 300 µl. Depois de aplicação da membrana, 0.13E6 células foram depositadas na parte de cima da membrana em um volume total de 70 µl. Foi permitida quimiotaxia por 3 horas a 37 C em uma câmara umidificada com CO<sub>2</sub>. Depois deste período de incubação, a membrana foi removida e as células na câmara do fundo foram ressuspensas. A quantidade de ATP presente na cavidade foi determinada usando o kit Cell-Titer-Glo (Promega, Madison WI, EUA). Foi realizada leitura em um Envision (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) com as configurações de fábrica de rotina para leitura da luminescência. Foram realizadas séries de titulações em triplicata e cada placa continha amostras de controle também em triplicata. Como controle, foi incluída uma amostra sem VHH bem como uma amostra onde não foi adicionada nenhuma Fractalcina humana à câmara de fundo. Os valores IC<sub>50</sub> obtidos estão

listados na TABELA 31.

**TABELA 31 QUIMIOTAXIA INDUZIDA POR FRACTALCINA NA PRESENÇA DE HSA**

ID do Constructo	Linhagem celular	IC50 (M)	% de bloqueio	Repetições
CX3CR1BII032	BA/F3-huCX3CR1	6E-10	98	2
CX3CR1BII034	BA/F3-huCX3CR1	9E-10	100	2
CX3CR1BII036	BA/F3-huCX3CR1	6E-10	102	2

**Inibição da internalização de Fractalcina pelos polipeptídeos formatados bivalentes de meia-vida estendida**

[00717] Testes funcionais adicionais foram realizados para demonstrar a atividade de antagonista dos polipeptídeos bivalentes de meia-vida estendida. Os polipeptídeos foram avaliados para sua capacidade para inibir a internalização de A647-Fractalcina em células CHO huCX3CR1. Em resumo, 1E4 células/cavidade foram laminadas em placas de 96 cavidades de fundo preto escuro transparente (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) e cultivadas de um dia para o outro. As células foram lavadas uma vez e em seguida equilibradas em tampão de teste (HBSS com cálcio e magnésio (Gibco) suplementado com 10 mM de HEPES e 0,1% de BSA). Os constructos de polipeptídeos formatados foram adicionados e as placas foram incubadas por 15 minutos a 37 C. A647-Fractalcina foi em seguida adicionada em uma concentração final de 8 nM e as células foram incubadas por 60 minutos a 37 C. O meio foi removido e as células foram fixadas por 10 minutos com 3,7% de solução de formaldeído (Polysciences, Warrington, PA, EUA). As células foram enxaguadas uma vez com PBS e os núcleos foram marcados com corante da Hoechst (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). De modo a quantificar a Fractalcina etiquetada internalizada, as células foram estudadas por imagem usando o sistema de bioimageamento BD Pathway. Foi realizada segmentação de imagens identificando o núcleo celular marcado e desenhando um anel de 3 píxeis em

torno daquela máscara. A intensidade média de A647 foi medida no anel citoplasmático. Os polipeptídeos formatados inibiram potentemente a internalização de Fractalcina conforme resumido na Tabela 32:

**TABELA 32 INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DE A647-FRACTALCINA**

ID do Constructo	Linhagem celular	IC50 (M)	Repetições
CX3CR1BII032	CHO-huCX3CR1	4,0 E-10	5
CX3CR1BII034	CHO-huCX3CR1	7,4 E-10	3
CX3CR1BII036	CHO-huCX3CR1	4,9 E-10	8
CX3CR1BII040	CHO-huCX3CR1	1,0 E-9	3
CX3CR1BII041	CHO-huCX3CR1	1,1 E-9	2
CX3CR1BII042	CHO-huCX3CR1	8,5 E-10	2

**Um polipeptídeo de meia-vida estendida bivalente formatado anti-CX3CR1 é destituído de atividade de agonista**

[00718] De modo a confirmar que um polipeptídeo de meia-vida estendida bivalente anti-CX3CR1 não tinha atividade de agonista, CX3CR1BII036 foi avaliado para indução de influxo de cálcio nas células CHO huCX3CR1. Fractalcina mediou aumentos nos níveis de cálcio citosólico nestas células em uma maneira dependente de CX3CR1 e CX3CR1BII036 inibiu esta resposta.

[00719] As células CHO huCX3CR1 foram laminadas a 5E4 células/cavidade em placas de 96 cavidades de fundo preto transparente (BD) e foram cultivadas de um dia para o outro. As células foram incubadas com corante Calcium-4 /2 mM de probenid (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) em HBSS suplementado com 20 mM de HEPES por 60 minutos a 37°C. Para demonstrar o antagonismo dos polipeptídeos, CX3CR1BII036 foi pré-incubado com as células por 15 minutos da adição de Fractalcina em seu valor de EC80. A mobilização de cálcio foi monitorada em um sistema FLIPR Tetra (Molecular Devices) de acordo com as instruções do fabricante. Para determinar o agonismo, não houve nenhuma pré-incubação com o polipeptídeo e ao invés,

CX3CR1BII036 foi usado ao invés da estimulação com Fractalcina. Enquanto CX3CR1BII036 inibiu o influxo de cálcio mediado pela Fractalcina com uma IC50 de 1,3 nM, não foram observados aumentos nos níveis de cálcio citosólico quando o polipeptídeo isolado foi adicionado em concentrações até 1  $\mu$ M.

**EXEMPLO 8: EXPLORAÇÃO DE FORMATOS DE EXTENSÃO DA MEIA-VIDA USANDO FC DE CAMUNDONGO**

[00720] De modo a investigar modalidades de extensão da meia-vida alternativas, o domínio VHH 66B02 foi produzido como uma proteína de fusão com um domínio de Fc de IgG2 de camundongo (66B02-mFc). Uma mutação de ácido aspártico para alanina (D265A) foi incorporada no domínio CH2 para anular a potencial função efetora mediada por Fc neste constructo (Baudino, J. Immunol., 181, 6664-6669 (2008)). 66B02-mFc foi expressado em células HEK293T ou células NS0 e purificado por cromatografia por afinidade de Proteína A seguida por cromatografia de permuta iônica. Esta molécula foi testada para atividade utilizando os formatos de teste descritos no Exemplo 7. Os resultados são resumidos na Tabela 33:

**TABELA 33 ATIVIDADE DE 66B02-MFC**

Teste	Linhagem celular	IC50 (M)	Repetições
Competição de ligante	BA/F3-huCX3CR1	5,7 E-10	2
Quimiotaxia	BA/F3-huCX3CR1	8,9 E-10	3
Internalização de Ligante	CHO-huCX3CR1	5,2 E-10	5
Influxo de cálcio	CHO-huCX3CR1	9,8 E-10	5

[00721] Apesar de 66B02-mFc ter inibido potentemente a ativação de CX3CR1 mediada pela Fractalcina, não apresentou atividade de agonista. Não foi observado nenhum aumento nos níveis de cálcio citosólico com tratamento com até 1  $\mu$ M desta molécula.

EXEMPLO 9: INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DE PLACAS EM UM MODELO DE ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGO DE POLIPEPTÍDEOS BIVALENTES DE MEIA-VIDA ESTENDIDA

***Produção de camundongos Apo E<sup>-/-</sup> de knock-in de CX3CR1 humana***

[00722] Dada a falta de reatividade cruzada dos VHHs identificados para CX3CR1 de camundongo (Exemplo 5), foi gerada uma linhagem de camundongo de knock-in de CX3CR1 humana (hu CX3CR1 KI) na TaconicArtemis (Koeln, Alemanha) para permitir experimentos destas moléculas em modelos de doença em camundongo. Foi empregada uma estratégia que permitiu a expressão do receptor de quimniocina humana sob o controle do promotor de camundongo correspondente enquanto ocorrendo a disrupção da expressão da proteína de camundongo endógena. Em resumo, foi construído um vetor de direcionamento onde a região codificante de CX3CR1 de camundongo no éxon 2 foi substituída com o frame de leitura aberta de CX3CR1 humana completo e flanqueada por marcadores de seleção e sítios loxP. O vetor de direcionamento foi introduzido em células ES de camundongo e clones que tinham sido submetidos com sucesso a recombinação homóloga foram usados para gerar camundongos quiméricos. Estes camundongos foram reproduzidos para camundongos altamente eficientes Flp-deleter de modo a obter a remoção do marcador de seleção e transmissão para a linhagem germinativa. Os camundongos hu CX3CR1 KI resultante em um pano de fundo C57BL/6 foram em seguida cruzados com camundongos Apo E<sup>-/-</sup> (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EUA) de modo a gerar camundongos hu CX3CR1 KI Apo E<sup>-/-</sup>. O modelo de camundongos Apo E<sup>-/-</sup> proporciona um método robusto para induzir extensiva formação de placas ateroscleróticas que é a grosso modo similar à doença humana com respeito à localização sítio-específica da formação de placas, à composição histológi-

ca, e aos fatores de risco conhecidos (colesterol, inflamação, hipertensão, etc).

**Avaliação dos polipeptídeos anti-CX3CR1 bivalentes de meia-vida estendida no modelo de aterosclerose em camundongo Apo E<sup>-/-</sup>**

[00723] Camundongos fêmeas hu CX3CR1KI ApoE<sup>-/-</sup> foram alimentados com uma dieta de alto teor de gordura/alto teor de colesterol contendo 1,5% de colesterol por 16 semanas iniciando em quatro semanas de idade. Depois de 10 semanas, os animais were administrados por injeção i.p. veículo (20 mM de Citrato de Na pH 6,0, 115 mM de NaCl), 10 mg/kg 66B02-mFc uma vez ou duas vezes por semana ou 30 mg/kg de CX3CR1BII036 duas vezes por semana por 6 semanas. Os animais foram anestesiados por anestesia com gás e perfundidos com salina a 0,9%. A aorta descendente para a bifurcação ilíaca foi cuidadosamente removida e fixada em formalina. Em seguida foi aberta longitudinalmente, e corada com Sudan IV por 15 minutos, seguido por metanol a 70% por 2 minutos. Os vasos foram lavados sob água corrente e cobertos com PBS. Os tecidos foram fotografados com uma câmera digital usando o software SPOT Advanced (SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, EUA). A percentagem de coloração de lipídeos foi determinada com software de análise de imagens (Image-Pro Plus, MediaCybernetics, Rockville, MD, EUA) e expressa como uma percentagem de coloração positiva do vaso. Os resultados deste estudo estão resumidos na Tabela 34:

**TABELA 34 QUANTIFICAÇÃO DO TAMANHO DE PLACA NA AORTA DESCENDENTE EM CAMUNDONGOS FÊMEAS HU CX3CR1 KI APO E<sup>-/-</sup>**

Grupo	Dose	No. de Animais	% da Área de Placas	% de Redução na Área de Placas
Controle (10 semanas)	N/A	6	3,4	N/A
Controle	Veículo	17	14,8	N/A

Grupo	Dose	No. de Animais	% da Área de Placas	% de Redução na Área de Placas
(16 semanas)				
66B02-mFc	10 mg/kg (1x/ semana)	17	13,0	16
66B02-mFc	10 mg/kg (2x/ semana)	17	10,3	39 (p<0,05)
CX3CR1BII036	30 mg/kg (2x/ semana)	17	10,1	41 (p<0,05)

[00724] Tanto 66B02-mFc quanto CX3CR1BII036 inibiram significativamente a progressão de placas quando dosados duas vezes por semana. Isto se correlacionou com a cobertura uma vez que os níveis plasmáticos destas moléculas podem ser confirmados para serem mantidos do início ao fim do estudo. Para dosagem de uma vez por semana de 66B02-mFc, não foram mantidos níveis plasmáticos detectáveis e isto se correlacionou com a falta de eficácia significativa observada depois de 6 semanas de tratamento. Nenhuma molécula afetou significativamente os níveis plasmáticos de colesterol ou triglicérides.

#### EXEMPLO 10: OTIMIZAÇÃO DE SEQUÊNCIA DO VHH PARENTAL

[00725] Em geral, durante otimização de sequência de VHH, sequências de VHH selvagem parental são mutadas para produzir sequências de VHH que são mais idênticas a sequências de consenso da linhagem germinativa VH3-JH humana. Aminoácidos específicos nas regiões de framework que diferem entre o VHH e o consenso da linhagem germinativa VH3-JH humana são alterados para o equivalente humano de tal modo que a estrutura, a atividade e a estabilidade da proteína são mantidas intactas. Para investigar isto, todas as variantes de otimização de sequência foram comparadas com o VHH parental em três testes diferentes: (i) determinação da temperatura de fusão ( $T_m$ ) em um teste de mudança térmica (TSA, Thermal Shift Assay), (ii) análise da potência in vitro em FACS de competição de fractalcina, e

para alguns constructos (iii) análise da potência in vitro no teste de quimiotaxia induzida pela fractalcina.

**Mutação de resíduos de framework**

[00726] Para otimização de sequência, foram investigadas as seguintes mutações: E1D, S11L, A14P, E16G, R44Q, D46E, A74S, K83R e Q108L. Os mutantes individuais que foram gerados na sequência parental de CX3CR1BII66B02 estão representados na Tabela 35:

**TABELA 35 MUTAÇÕES INVESTIGADAS DURANTE OTIMIZAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE 66B02**

<b>Número do Clone</b>	<b>Mutações introduzidas</b>
C100CX3CR1BII043	A14P,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII045	E1D,A14P,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII047	S11L,A14P,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII048	A14P,E16G,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII049	A14P,R44Q,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII050	A14P,D46E,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII061	S11L,A14P,E16G,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII056	S11L,A14P,E16G,R44Q,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII057	S11L,A14P,E16G,D46E,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII060	S11L,A14P,E16G,R44Q,D46E,A74S,K83R,Q108L

[00727] Todos os constructos foram clonados em um vetor de expressão em *E. coli*, e expressados em *E. coli* como proteínas com etiqueta myc/His em um volume de cultura de 0,25 L a 0,5 L de meio TB. Foi induzida expressão por adição de 1 mM de IPTG e deixada para continuar por 4 horas a 37°C e 250 rpm. As células foram peletizadas, e extratos periplasmáticos foram preparados por congelamento-descongelamento e ressuspensão em dPBS. Estes extratos foram usados como material de partida para cromatografia por afinidade com metal imobilizado (IMAC) usando colunas brutas Histrap FF (GE healthcare). Nanobodies foram elutriados da coluna com 250 mM de imidazol e em seguida dessalgados para dPBS. A pureza e a integridade

dos Nanobodies foi verificada por SDS-PAGE redutor.

[00728] Conforme resumido na Tabela 36, as mutações A14P, A74S, K83R e Q108L não tiveram nenhum efeito claro sobre a potência conforme determinado a partir do FACS de competição. De modo similar, as mutações adicionais E1D, S11L e E16G não afetaram a potência. Por outro lado, a introdução de ou R44Q ou D46E resultou em uma queda significativa na potência que foi ainda mais pronunciada no caso de ambas as mutações terem sido introduzidas.

**TABELA 36 POTÊNCIA DE CONSTRUCTOS DE OTIMIZAÇÃO DE SEQUÊNCIA DETERMINADOS POR FACS DE COMPETIÇÃO DE LIGANTE**

Número do Clone	IC50	% de bloqueio	Tm em pH 7
CX3CR1BII66B02	2.6E-09	101,0	65,66
C100CX3CR1BII043	2.2E-09	101	66,49
C100CX3CR1BII045	2.2E-09	101,2	66,07
C100CX3CR1BII047	2.3E-09	101,2	66,49
C100CX3CR1BII048	1.9E-09	101,2	67,74
C100CX3CR1BII049	1.8E-08	101,2	66,07
C100CX3CR1BII050	1.7E-08	101,1	71,90
C100CX3CR1BII061	1.4E-09	98,9	68,57
C100CX3CR1BII056	1.6E-08	101,1	68,57
C100CX3CR1BII057	1.4E-08	99,4	74,39
C100CX3CR1BII060	1.9E-07	98,4	74,81

[00729] Além disso, foi avaliada a temperatura de fusão, preditiva para a estabilidade do VHH. A maioria das mutações individuais teve efeito limitado ou nenhum efeito com a exceção da mutação D46E, a qual aumentou a temperatura de fusão por aproximadamente 6°C. A introdução das mutações combinadas também aumentou a estabilidade térmica, cfr 057 e 060.

[00730] Devido aos importantes efeitos sobre a potência no FACS de competição de ligante, as mutações R44Q e D46E não foram inclu-

ídas na sequência final.

### **Mutação de resíduos CDR**

[00731] Com base na análise *in silico* da sequência parental, um sítio de glicosilação foi previsto na posição 52. Portanto foram construídas duas bibliotecas; uma para a posição 52 e uma para a posição 53, a qual foi projetada para incluir todos os aminoácidos possíveis na respectiva posição. As bibliotecas foram triadas como extratos periplasmáticos em um FACS de competição de ligante. Primeiro, uma série de diluições foi feita de material periplasmático da sequência parental e três diluições foram selecionadas para triagem posterior. Um primeiro ponto de diluição (duas vezes) foi escolhido para proporcionar bloqueio total da interação do ligante ao passo que os outros dois pontos de diluição (128 e 512 vezes) vão resultar em 70% e 40% de bloqueio respectivamente. Depois da produção dos extratos periplasmáticos da biblioteca, todas as amostras foram divididas em duas e uma delas foi submetida a um tratamento com calor. Tanto as amostras não tratadas quanto as tratadas com calor foram em seguida analisadas no FACS de competição de ligante nos três pontos de diluição. O impacto da mutação pode ser estimada comparando o bloqueio obtido com o bloqueio da sequência parental. A análise das amostras tratadas com calor proporciona uma medida para um potencial impacto sobre a estabilidade da mutação.

[00732] Com base nos resultados de triagem inicial, sete mutações foram selecionadas para caracterização posterior. A potência obtida no FACS de competição de ligante é mostrada na Tabela 37.

**TABELA 37 REMOÇÃO DE SÍTIO DE GLICOSILAÇÃO NA POSIÇÃO 52**

Constructo	IC50 (M)	% de bloqueio	Tm em pH 7
C100CX3CR1BII66B02	2.5E-09	98,0	65,66
CX3CR1BII66B02 (N52S, Q108L)	1.7E-09	98,0	66,07

Constructo	IC50 (M)	% de bloqueio	Tm em pH 7
CX3CR1BII66B02 (N52Q, Q108L)	2.1E-09	97,9	59,83
CX3CR1BII66B02 (N52G, Q108L)	1.1E-09	98,0	59,83
CX3CR1BII66B02 (N52T, Q108L)	2.8E-09	98,0	66,07
CX3CR1BII66B02 (S53T, Q108L)	1.3E-09	98,1	66,07
CX3CR1BII66B02 (S53G, Q108L)	1.2E-09	98,3	64,83
CX3CR1BII66B02 (S53P, Q108L)	8.0E-10	98,2	66,91

[00733] A partir desta análise, alinhamento de sequência com a sequência de referência humana e com base em um programa de previsão de reconhecimento de epítipo de células T *in silico*, foi decidido incluir as mutações N52S e S53T na sequência.

[00734] Por questões de estabilidade, foi produzida uma biblioteca adicional para a posição 32. A triagem de competição de ligante foi configurada em um modo similar conforme descrito acima. Novamente três diluições dos extratos periplasmáticos foram triadas e a % de bloqueio obtida foi comparada com % de bloqueio obtida para a sequência parental. Depois de análise dos vários mutantes, a substituição de N32T foi escolhida e incluída na variante de sequência final otimizada.

#### EXEMPLO 11: ANÁLISE DAS VARIANTES OTIMIZADAS

[00735] Em uma rodada de caracterização final foram caracterizados os constructos listados na TABELA 38.

#### **TABELA 38 VARIANTES DE SEQUÊNCIA OTIMIZADA DO VHH 66B02 LIDER**

Número do Clone	Mutação introduzida	SEQ ID NO:
CX3CR1BII00306	CX3CR1BII66B02(E1D,S11L,A14P,E16G,N32T,N52S,A74S,K83R,Q108L)	138
CX3CR1BII00307	CX3CR1BII66B02(E1D,S11L,A14P,E16G,N32T,N52S,S53T,A74S,K83R,Q108L)	139
CX3CR1BII00308	CX3CR1BII66B02(E1D,S11L,A14P,E16G,A74S,K83R,Q108L)	140
CX3CR1BII00312	CX3CR1BII66B02(E1D,S11L,A14P,E16G,N32	225

	T,N52S,A74S,K83R,Q108L)-9GS-Alb11-9GS-CX3CR1BII66B02(S11L,A14P,E16G,N32T,N52S,A74S,K83R,Q108L)	
CX3CR1BII00313	CX3CR1BII66B02(E1D,S11L,A14P,E16G,N32T,N52S,S53T,A74S,K83R,Q108L)-9GS-Alb11-9GS-CX3CR1BII66B02(S11L,A14P,E16G,N32T,N52S,S53T,A74S,K83R,Q108L)	226
CX3CR1BII00314	CX3CR1BII66B02(E1D,S11L,A14P,E16G,A74S,K83R,Q108L)-9GS-Alb11-9GS-CX3CR1BII66B02(S11L,A14P,E16G,A74S,K83R,Q108L)	227

[00736] Foi realizado um experimento de FACS de competição conforme descrito acima bem como uma determinação da temperatura de fusão. Os valores obtidos são representados na Tabela 39.

**TABELA 39 FACS DE COMPETIÇÃO E TEMPERATURA DE FUSÃO (TM) DA VARIANTES DE SEQUÊNCIA OTIMIZADA**

Constructo	IC50 (M)	% de bloqueio	Tm em pH 7
C100CX3CR1BII66B02	2.5E-09	98,0	65,05
CX3CR1BII00306	1.7E-09	97,0	68,54
CX3CR1BII00307	1.9E-09	97,0	68,13
CX3CR1BII00308	1.6E-09	97,0	68,13
CX3CR1BII00312	4.6E-10	100,0	59,37
CX3CR1BII00313	4.0E-10	100,0	58,88
CX3CR1BII00314	6.5E-10	100,0	58,40

[00737] Estes constructos também foram caracterizados em quimiotaxia induzida pela fractalcina conforme descrito acima (Tabela 40).

**TABELA 40 QUIMIOTAXIA INDUZIDA POR LIGANTE COM VARIANTES DE SEQUÊNCIA OTIMIZADA**

Constructo	IC50 (M)	% de bloqueio	n
C100CX3CR1BII66B02	3.6E-08	91	3
CX3CR1BII00306	6.3E-08	95	2

Constructo	IC50 (M)	% de bloqueio	n
CX3CR1BII00307	6.3E-08	100	2
CX3CR1BII00308	4.4E-08	89	2
CX3CR1BII00312	2.7E-09	99	3
CX3CR1BII00313	2.7E-09	99	3
CX3CR1BII00314	3.6E-09	100	3

[00738] Constructos selecionados foram avaliados para inibição da internalização induzida A647-Fractalcina em células CHO huCX3CR1.

Os resultados são resumidos na Tabela 41:

**TABELA 41 INTERNALIZAÇÃO INDUZIDA POR LIGANTE COM VARIANTES DE SEQUÊNCIA OTIMIZADA**

Constructo	IC50 (M)	n
CX3CR1BII00312	5.5 E-10	1
CX3CR1BII00313	3.3E-10	6

**Um polipeptídeo de sequência otimizada anti-CX3CR1 de meia-vida estendida é destituído de atividade agonista**

[00739] De modo a confirmar que o polipeptídeo de sequência otimizada anti-CX3CR1 de meia-vida estendida não tem atividade agonista, CX3CR1BII00313 foi avaliado para indução do influxo de cálcio nas células CHO huCX3CR1. Enquanto a pré-incubação com CX3CR1BII00313 inibiu o influxo de cálcio mediado pela Fractalcina com uma IC50 de 1,3 nM, não foi observado nenhum aumento nos níveis de cálcio citosólicos quando o polipeptídeo isolado foi adicionado em concentrações até 1 µM.

**EXEMPLO 12: EXPLORAÇÃO DE FORMATOS DE EXTENSÃO DA MEIA-VIDA USANDO FC HUMANO**

[00740] De modo a investigar modalidades de extensão da meia-vida adicionais, os domínios VHH de sequência otimizada CX3CR1BII00306 e CX3CR1BII00307 foram produzidos como proteínas de fusão com um domínio de Fc de IgG1 humana (306D-hFc e

307D-hFc). Duas mutações foram incorporadas no domínio CH2 para anular potencial função efetora mediada por Fc neste constructo. 306D-hFc e 307D-hFc foram expressados em células HEK293T ou células NS0 e purificados por cromatografia por afinidade por Proteína A seguida por cromatografia de permuta iônica. Estas moléculas foram testadas para atividade funcional utilizando os formatos de teste descritos no Exemplo 7. Os resultados estão resumidos na Tabela 42:

**TABELA 42 ATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE FUSÃO HFC**

Teste	Linhagem celular	IC50 de 306D-hFc	Repetições de 306D-hFc	IC50 de 307D-hFc	Repetições de 307D-hFc
Competição de ligante	BA/F3-huCX3CR1	6.9 E-10	2	7,0 E-10	2
Quimiotaxia	BA/F3-huCX3CR1	2.9 E-9	2	3,0 E-9	3
Internalização de ligante	CHO-huCX3CR1	4.8 E-10	3	3,7 E-10	3
Influxo de cálcio	CHO-huCX3CR1	1.3 E-9	3	3,2 E-9	3

[00741] Apesar destas moléculas terem inibido potentemente a ativação de CX3CR1 mediada pela Fractalcina, não apresentaram atividade agonista. Não foram observados aumentos nos níveis de cálcio citosólico com tratamento com até 1  $\mu$ M destes Nanobodies isolados.

**EXEMPLO 13: INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DE PLACA EM UM MODELO DE ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGO POR UM NANOBODY ANTI-CX3CR1 DE SEQUÊNCIA OTIMIZADA**

[00742] Camundongos fêmeas hu CX3CR1KI ApoE<sup>-/-</sup> foram alimentados com uma dieta de alto teor de gordura/alto teor de colesterol contendo 1,5% de colesterol por 16 semanas iniciando em quatro semanas de idade. Depois de 10 semanas, os animais foram administrados por injeção i.p. veículo (20 mM de Citrato de Na pH 6,0, 115 mM

de NaCl), 30 mg/kg de CX3CR1BII00313 uma vez ou duas vezes por semana ou 30 mg/kg de CX3CR1BII036 duas vezes por semana por 6 semanas. Os animais foram sacrificados e a percentagem da área de placas na aorta descendente foi quantificada conforme descrito acima. Os resultados deste estudo estão resumidos na Tabela 43:

**TABELA 43 QUANTIFICAÇÃO DO TAMANHO DE PLACAS NA AORTA DESCENDENTE EM CAMUNDONGOS FÊMEAS HU CX3CR1 KI APO E <sup>-/-</sup>**

Grupo	Dose	No. Ani- mais	% da Área de Placas	% de Re- dução na Área de Placas
Controle (10 sema- nas)	N/A	6	2,1	N/A
Controle (16 sema- nas)	Veículo	18	12,0	N/A
CX3CR1BII00313	30 mg/kg (1x/ semana)	17	10,7	13
CX3CR1BII00313	30 mg/kg (2x/ semana)	18	5,9	62 (p<0,01)
CX3CR1BII036	30 mg/kg (2x/ semana)	17	6,8	52 (p<0,01)

[00743] Tanto CX3CR1BII00313 quanto CX3CR1BII036 inibiram significativamente a progressão de placas quando dosados duas vezes por semana. Isto se correlacionou com a cobertura uma vez que os níveis plasmáticos destas moléculas pode ser confirmado como sendo mantido do início ao fim do estudo. Para dosagem uma vez por semana de CX3CR1BII00313, não foram mantidos níveis plasmáticos detectáveis e isto se correlacionou com a falta de eficácia significativa observada depois de 6 semanas de tratamento. Nenhuma molécula afetou significativamente os níveis plasmáticos de colesterol ou triglicérides.

EXEMPLO 14: LIGAÇÃO DE NANOBODY A CÉLULAS CD14+ PRI-

MÁRIAS HUMANAS E DE MACACO CYNOMOLGUS NO SANGUE TOTAL

**FACS de Competição com Nanobody anti-CX3CR1 de sequência otimizada formatado**

[00744] De modo a confirmar a ligação do Nanobody anti-CX3CR1 de sequência otimizada formatado a células primárias humanas, foi demonstrado que CX3CR1BII00313 compete pela ligação de CX3CR1BII018 marcado com A647 (A647-018) a células CD14+ em um teste FACS de competição no sangue total. Em resumo, um anti-corpo CD14 anti-humano de camundongo conjugado com eFluor 450 (eBioscience, San Diego, CA, EUA) foi diluído a 1:10 em sangue total tratado com EDTA de um doador humano saudável. 40 µl/ cavidade foi adicionado a placa de fundo redondo de poliestireno de 96 cavidades seguido por 10 µl/ cavidade de CX3CR1BII00313 diluído em Stain Buffer com BSA (BD Pharmingen) em uma concentração final variando de 100 nM a 0,002 pM e as amostras foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. 10 µl/ cavidade de A647-018 em Stain Buffer foi em seguida adicionado para produzir uma concentração final de 1 nM (a EC80 da ligação de A647-018) e as amostras foram incubadas por um adicional de 20 minutos em temperatura ambiente. 220 µl/ cavidade de solução 1-Step Fix/Lyse (eBioscience) foi em seguida adicionado. Depois de uma incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, as células foram peletizadas, lavadas duas vezes em Stain buffer e ressuspendidas neste tampão. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo BD LSR II. A intensidade de fluorescência média para AlexaFluor 647 foi quantificada para *gate* a população de células CD14 positivas. CX3CR1BII00313 inibiu potentemente a ligação de A647-018 a células CD14 positivas no sangue humano com uma IC50 de 0,35 nM (n=8).

[00745] De modo a confirmar a ligação do Nanobody anti-CX3CR1

de sequência otimizada formatado para células primárias de macaco cynomolgus, foi demonstrado que CX3CR1BII00313 compete pela ligação de CX3CR1BII018 marcado com A647 (A647-018) a células CD14+ em um teste FACS de competição no sangue total de macaco cynomolgus. O método usado foi análogo ao método resumido acima com a exceção de que a concentração final de A647-018 foi de 3 nM (a EC80 da ligação de A647-018) e tampão de lise ACK (Life Technologies) foi usado ao invés da solução 1-Step Fix/Lyse. As células foram ressuspensas em Stain buffer suplementado com 1% de formaldeído antes da análise. CX3CR1BII00313 inibiu potentemente a ligação de A647-018 a células CD14 positivas no sangue de macaco cynomolgus com uma IC50 de 0,43 nM (n=4).

#### EXEMPLO 15: FARMACOCINÉTICA (PK) EM MACACOS CYNOMOLGUS

[00746] Um estudo farmacocinético foi conduzido em macacos cynomolgus machos *naïve* (*Macaca fascicularis*) de 2 a 5 anos de idade com uma faixa de peso corporal entre 2,4 a 3,5 kg. Os macacos foram divididos em quatro grupos de tratamento. O Grupo 1 (n=3) recebeu 0,2 mg/kg de CX3CR1BII00313 i.v.; Grupo 2 (n=3) recebeu 2 mg/kg de CX3CR1BII00313 i.v.; Grupo 3 (n=3) recebeu 2 mg/kg de CX3CR1BII00313 s.c. e Grupo 4 (n=3) recebeu 5 mg/kg de CX3CR1BII00313 i.v. CX3CR1BII00313 foi administrado como uma solução a 2 mg/mL em tampão de citrato (20 mM de citrato de sódio/115 mM de cloreto de sódio, pH 6,0). Amostras de sangue foram coletadas durante 6 semanas a partir de uma veia periférica para tubos de separador de soro para análise farmacocinética.

[00747] As amostras de soro foram analisadas usando um formato MSD (Meso Scale Discovery). Em resumo, um anticorpo anti-Nanobody biotinilado foi ligado a uma placa de estreptavidina padrão MSD (Meso Scale Discovery, Rockville, MD, EUA). As placas foram

lavadas com 0,05% de Tween 20 em salina tamponada com fosfato e bloqueadas com 5% em peso/volume de SeraCare BSA (SeraCare Life Sciences, Milford, MA, EUA) antes de incubação com as amostras de soro. CX3CR1BII00313 foi detectado utilizando um Nanobody anti-Nanobody sulfo-marcado e as placas foram analisadas em um Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery). Concentrações variáveis de CX3CR1BII00313 de 5000 a 0,5 ng/mL em 5% de soro de macaco foram usadas como padrões. O envolvimento-alvo foi avaliado monitorando os níveis de CX3CR1 livre sobre monócitos CD14+ *gated*. Este teste foi análogo ao teste FACS de competição resumido no Exemplo 14 com a exceção de que não foi acrescentado nenhum CX3CR1BII00313 adicional. As amostras de soro também foram monitoradas para a presença de anticorpos anti-humanos de primata (PAHA) uma vez que podem impactar a avaliação da farmacocinética e de CX3CR1 livre.

[00748] ForteBio RED96 foi usado para detecção de PAHA. Em resumo, CX3CR1BII00313 biotinilado foi capturado sobre sensores de estreptavidina. Soro de macaco naïve agrupado foi em seguida usado como um controle negativo para calcular o valor de corte (definido como duas vezes acima do sinal de ligação média de soros naïve). Todas as amostras de soro foram diluídas 20 vezes em tamção e a resposta de PAHA foi determinada como sendo positiva se o sinal de ligação foi maior do que o valor de corte.

[00749] Dados para pontos do tempo depois da detecção de PAHA foram excluídos da análise farmacocinética/farmacodinâmica. Os dados farmacocinéticos estão resumidos na Tabela 44 abaixo.

**TABELA 44 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE CX3CR1BII00313**

Dose (mg/kg)	CL (mL/dia/kg)	T <sub>1/2</sub> (dia)	MRT (dia)	AUC(0-14d) Dose normalizada (nM·d)	F%
IV 0.2	113	1	1	**	
IV 2.0	9 ± 1	9 ± 2	8 ± 2	56530	
IV 5.0	**	**	**	58604	
SC 2.0					54

[00750] \*\*dados insuficientes para caracterização da fase terminal

[00751] O clearance e a meia-vida a 2,0 mg/kg i.v. foram de 9,4 mL/d/kg e de 9,6 dias, respectivamente. A 0,2 mg/kg i.v., o clearance foi substancialmente maior (113 mL/d/kg) consistente com farmacocinética de disposição mediada por alvo (TMD) saturável. A AUC<sub>(0-14d)</sub> dose-ajustada foi comparável entre as doses de 2 e de 5 mg/kg i.v. sugerindo saturação da TMD na dose de 2 mg/kg. A exposição em 2 semanas depois da administração de Nanobody ou i.v. ou s.c. foi > 70 nM e a biodisponibilidade depois de administração s.c. foi de 54%. Receptor livre ratreado com exposição com mais de 90% de cobertura média mantida em exposições > 10 nM.

## REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 (anti-CX3 quimiocina receptor 1), em que o referido polipeptídeo é capaz de bloquear a ligação de fractalcina humana à CX3CR1 humana, em que o referido polipeptídeo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências de aminoácidos definidas na:

- SEQ ID No: 147, 178 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 147, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 148, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 180 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 181 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 183 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 185 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 150, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 150, 182 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 151, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 151, 182 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 151, 184 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 152, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 153, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 154, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 155, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 156, 181 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 157, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 158, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 159, 178 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 160, 179 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 161, 179 e 197, respectivamente; ou

- SEQ ID No: 213, 221 e 197, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 213, 214 e 197, respectivamente.

2. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o domínio variável único da imunoglobulina anti-CX3CR1 consiste essencialmente em quatro regiões estruturais (FR1, FR2, FR3 e FR4) e três regiões determinantes complementares (CDR1, CDR2 e CDR3).

3. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio variável único da imunoglobulina anti-CX3CR1 é um VH, VL, VHH, VH camelizado ou VHH que é otimizado para estabilidade, potência, capacidade de fabricação e / ou similaridade para regiões de framework humanas.

4. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o referido polipeptídeo compreende um CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências de aminoácidos definidas na:

- SEQ ID No: 147, 178 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 147, 179 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 147, 179 e 194, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 148, 179 e 193, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 179 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 180 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 181 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 183 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 149, 185 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 150, 179 e 194, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 150, 182 e 194, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 151, 179 e 193, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 151, 182 e 194, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 151, 184 e 196, respectivamente; ou

- SEQ ID No: 152, 179 e 195, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 153, 179 e 194, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 154, 182 e 194, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 155, 179 e 195, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 156, 181 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 157, 179 e 194, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 158, 179 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 159, 178 e 192, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 160, 179 e 194, respectivamente; ou
- SEQ ID No: 161, 179 e 194, respectivamente.

5. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o referido domínio variável único de imunoglobulina anti-CX3CR1 é um domínio VHH compreendendo a sequência definida:

- a) na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; ou
- b) uma sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 53-120.

6. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende ainda uma porção de prolongamento da meia-vida.

7. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a referida porção de prolongamento da meia-vida é ligada de modo covalente ao referido polipeptídeo e é selecionada do grupo consistindo em uma porção de ligação de albumina, tal como um domínio de imunoglobulina anti-albumina, uma porção de ligação de transferrina, tal como um domínio de imunoglobulina anti-transferrina, uma molécula de polietileno glicol, uma molécula de polietileno glicol recombinante, albumina sérica humana, um fragmento de albumina sérica humana, um peptídeo de ligação de albumina ou um domínio de Fc.

8. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que a referida porção de prolongamento da meia-vida consiste em um domínio variável único de imunoglobulina anti-albumina.

9. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o domínio variável único de imunoglobulina anti-albumina compreende uma sequência selecionada de qualquer uma de SEQ ID NO's: 230 a 232.

10. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o domínio variável único de imunoglobulina é selecionado de um domínio VHH, um domínio VHH humanizado, um domínio VH camelizado, um anticorpo de domínio, um anticorpo de domínio único e/ou "dAb"s.

11. Célula hospedeira bacteriana, de levedura ou fúngica, caracterizada pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucléico codificando um polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a referida célula hospedeira é capaz de expressar o referido polipeptídeo.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende (i) um polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, e (ii) um veículo farmacêuticamente aceitável, e opcionalmente (iii) um diluente, um excipiente, um adjuvante e/ou um estabilizante.

13. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a referida composição farmacêutica é adequada para injeção intravenosa ou subcutânea em um ser humano.

14. Método de fabricar um polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de

- cultivar uma célula hospedeira sob condições que permitem a expressão de um polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10,

em que a referida célula hospedeira está carregando um vetor de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucléico, a referida molécula de ácido nucléico compreendendo uma região codificando um polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, e em que a referida célula hospedeira é uma célula procariótica ou uma célula eucariótica.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende as etapas de

- recuperar o referido polipeptídeo; e
- purificar o referido polipeptídeo.

16. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento, na prevenção ou na mitigação de uma doença, um distúrbio ou uma condição, em um ser humano.

17. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a doença, o distúrbio ou a condição é uma doença, um distúrbio ou uma condição associada com CX3CR1.

18. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a doença, o distúrbio ou a condição é selecionado de distúrbios ateroscleróticos cardio- e cerebrovasculares, doença arterial periférica, restenose, nefropatia diabética, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescente humana, nefropatia por IgA, nefropatia membranosa, nefrite lúpica, vasculite incluindo púrpura de Henoch-Schonlein e granulomatose de Wegener, artrite reumatoide, osteoartrite, rejeição de aloenxerto, esclerose sistêmica, distúrbios neurodegenerativos e doença desmielinizante, esclerose múltipla (em inglês, MS), mal de Alzheimer, doenças pulmonares tais como doença pul-

monar obstrutiva crônica, asma, dor neuropática, dor inflamatória, ou câncer.

19. Polipeptídeo para uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a doença, o distúrbio ou a condição é aterosclerose.

20. Kit de diagnóstico, caracterizado pelo fato de que compreende um polipeptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, e um ou mais meios, meios de detecção e/ou agentes de imagem, e ainda opcionalmente, instruções de uso; em que o referido kit é adequado para o diagnóstico de uma doença, distúrbio ou condição caracterizada por disfunção CX3CR1.

21. Kit de diagnóstico ou um método de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de ser para o diagnóstico de no mínimo um de distúrbios ateroscleróticos cardio- e cerebrovasculares, doença arterial periférica, restenose, nefropatia diabética, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescente humana, nefropatia por IgA, nefropatia membranosa, nefrite lúpica, vasculite incluindo púrpura de Henoch-Schonlein e granulomatose de Wegener, artrite reumatoide, osteoartrite, rejeição de aloenxerto, esclerose sistêmica, distúrbios neurodegenerativos e doença desmielinizante, esclerose múltipla (em inglês, MS), mal de Alzheimer, doenças pulmonares tais como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, dor neuropática, dor inflamatória, ou câncer.

22. Método de diagnóstico, caracterizado pelo fato de que compreende, a partir de uma amostra de um indivíduo, as etapas de:

a) contatar a amostra com um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10;

b) determinar a quantidade de CX3CR1 na amostra; e

c) comparar a quantidade determinada na etapa (b) com um padrão, em que uma diferença na quantidade em relação à referi-

da amostra é diagnóstica de uma doença, distúrbio ou condição caracterizada por disfunção de CX3CR1.

23. Método de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que é para o diagnóstico de pelo menos um dentre distúrbios ateroscleróticos cardio- e cerebrovasculares, doença arterial periférica, restenose, nefropatia diabética, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescente humana, nefropatia por IgA, nefropatia membranosa, nefrite lúpica, vasculite incluindo púrpura de Henoch-Schonlein e granulomatose de Wegener, artrite reumatoide, osteoartrite, rejeição de aloenxerto, esclerose sistêmica, distúrbios neurodegenerativos e doença desmielinizante, esclerose múltipla (em inglês, MS), mal de Alzheimer, doenças pulmonares tais como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, dor neuropática, dor inflamatória, ou câncer.