

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

(22) Data de pedido: <b>2005.04.05</b>	(73) Titular(es): <b>F.HOFFMANN-LA ROCHE AG</b> <b>GRENZACHERSTRASSE 124 4070 BASEL CH</b>
(30) Prioridade(s): <b>2004.04.13 EP 04008722</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2007.01.03</b>	(72) Inventor(es): <b>JACQUES HIMBER</b> FR <b>ANNE STERN</b> DE <b>PAUL PARREN</b> NL <b>FRANK REBERS</b> NL <b>JAN VAN DE WINKEL</b> NL
(45) Data e BPI da concessão: <b>2013.03.06</b> <b>073/2013</b>	(74) Mandatário: <b>JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO</b> <b>R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA</b> PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI P-SELECTINA**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO RELACIONA-SE COM ANTICORPOS ANTI PSELECTINA E, EM ESPECIAL, COM ANTICORPOS ANTI P-SELECTINA E SUAS VARIANTES, QUE CONTÊM UMA PARTE FC DERIVADA DE UMA ORIGEM HUMANA, E NÃO SE LIGAM AO FACTOR COMPLEMENTO C1Q. ESTES ANTICORPOS TÊM PROPRIEDADES NOVAS E INVENTIVAS TRAZENDO BENEFÍCIOS A UM PACIENTE QUE SOFRA DE ISQUÊMIA CRÍTICA DE MEMBROS OU DE DOENÇA OCLUSIVA ARTERIAL PERIFÉRICA (CLI/PAOD).

**RESUMO**

**"ANTICORPOS ANTI P-SELECTINA"**

Esta invenção relaciona-se com anticorpos anti P-selectina e, em especial, com anticorpos anti P-selectina e suas variantes, que contêm uma parte Fc derivada de uma origem humana, e não se ligam ao factor complemento Clq. Estes anticorpos têm propriedades novas e inventivas trazendo benefícios a um paciente que sofra de isquémia crítica de membros ou de doença oclusiva arterial periférica (CLI/PAOD).

## DESCRIÇÃO

### "ANTICORPOS ANTI P-SELECTINA"

A invenção diz respeito a um anticorpo que se liga a P-selectina, não se ligando ao factor complemento C1q e não se ligando a receptores Fc $\gamma$  em células NK, contendo uma parte Fc derivada de origem humana, e sendo caracterizado por ser um anticorpo da subclasse humana IgG4 em que S228 está substituído por P e L235 substituído por E, inibindo a adesão de células HL60 semelhantes a leucócitos a P-selectina purificada com um valor de IC<sub>50</sub> de entre 0,08 e 0,5  $\mu$ g/mL, e incluindo as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 do domínio variável da cadeia leve definida pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 e pelas regiões CDR1, CDR2 e CDR3 do domínio da cadeia pesada, definido pela SEQ ID NO: 4. A descrição diz em geral respeito a anticorpos anti-P-selectina e, em especial, a anticorpos anti-P-selectina que não se ligam ao factor complemento C1q. Preferivelmente, os anticorpos descritos neste documento são anticorpos humanos ou humanizados.

A P-selectina (CD62P, GMP-140, PADGEM, LECAM-3) é uma proteína com 140 kDa dependente de cálcio que se liga a hidratos de carbono, a qual é expressa nas superfícies de plaquetas activadas e no endotélio em resposta à trombina e a outros agonistas (McEver *et al.*, J. Biol. Chem. **270**:

11025 (1995); Varki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 7390 (1994); Springer TA, Annu. Rev. Physiol. **57**: 827 (1995)). Em ambos os tipos de células, a P-selectina está armazenada em grânulos de secreção, isto é em grânulos  $\alpha$  nas plaquetas e em corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais (McEver *et al.*, J. Clin. Invest. **84**: 92 (1984)). Trata-se de uma glicoproteína transmembranar de tipo I que é constituída por um domínio de lectina no terminal NH<sub>2</sub>, seguindo-se um domínio do tipo EGF, nove repetições de consenso curtas com homologia a proteínas reguladoras de complemento, um domínio transmembranar, e uma cauda citoplásmica curta (Johnston *et al.*, Cell **56**: 1033 (1989)). A estrutura da P-selectina é semelhante aos dois outros membros da família da selectina, as selectinas E e L, que estão quer expressas nas células endoteliais activadas por citoquina (E-selectina) ou constitutivamente expressas na maior parte das classes de leucócitos (L-selectina).

Sabe-se que todas as selectinas se ligam com pequena afinidade a pequenos oligossacáridos sialilados, fucosilados, tais como o sialil Lewis x (sLe<sup>x</sup>; Foxall *et al.*, J. Cell Biol. **117**: 895 (1992); Varki, Curr. Opin. Cell Biol. **257**: 257 (1992)). A P-selectina e a L-selectina, mas não a E-selectina, também se ligam a hidratos de carbono sulfatados específicos, tal como o sulfato de heparina (veja-se uma revisão em McEver e Cummings, J. Clin. Invest. **100**: 597 (1997)). Os ligandos de alta afinidade para a P-selectina são glicoproteínas do tipo da mucina (McEver *et al.*, J. Biol. Chem. **270**: 11025 (1995)),

constituídas por um esqueleto polipeptídico com aglomerados de O-glicanas sialiladas. Um ligando sialomucina ao qual a P-selectina se liga preferivelmente é a Glicoproteína ligando 1 da P-selectina (PSGL-1, CD162), que normalmente está expressa como homodímero com duas subunidades ligadas por dissulfuretos, com massas moleculares relativas de cerca de 120 kDa, por leucócitos circulantes. O local de ligação da P-selectina está localizado na parte extrema do terminal NH<sub>2</sub> de PSGL-1. Através da sua ligação aos seus ligandos, a P-selectina media o rolamento dos leucócitos sobre as plaquetas activadas e sobre as células endoteliais. O processo de rolamento diminui eficazmente a velocidade do movimento dos leucócitos, condição necessária para uma adesão firme e uma transmigração subsequente dos leucócitos para o subendotélio, mas também para a acumulação de leucócitos nos trombos.

Em estudos recorrendo a murganhos deficientes em P-selectina e anticorpos bloqueando especificamente a P-selectina, mostrou-se que a P-P-selectina participa na patofisiologia de numerosas doenças inflamatórias agudas e crónicas, incluindo as lesões de isquémia/reperfusão (Winn *et al.*, *J. Clin. Invest.* **92**: 2042 (1993); Massberg *et al.*, *Blood* **92**: 507 (1998)). Além disto, existe uma clara contribuição da P-selectina nas doenças cardiovasculares que possuem uma componente inflamatória, tais como a aterosclerose (Collins *et al.*, *J. Exp. Med.* **191**: 189 (2000); Johnson *et al.*, *J. Clin. Invest.* **99**: 1037 (1997)), a restenose (Manka *et al.*, *Circulation* **103**: 1000 (2001);

Bienvenu *et al.*, *Circulation* **103**: 1128 (2001)) e a trombose (Kumar *et al.*, *Circulation* **99**: 1363 (1999); Andre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13835 (2000); Blann *et al.*, *Br. J. Haematol.* **108**: 191 (2000); Myers *et al.*, *Thromb. Haemostasis* **85**: 423 (2001). Evidentemente, a inibição da função da P-selectina seria eficaz a título de terapia em diversas doenças que envolvam a aderência de leucócitos ou de plaquetas ao endotélio vascular (veja-se, por exemplo, o WO 93/06.863, e o WO 94/25.067).

Já se encontram descritos anticorpos contra a P-selectina no estado da técnica e eles foram investigados quanto aos seus efeitos anti-inflamatórios e anti-trombóticos. Na patente US 4.783.399 e no WO 93/06.863 descrevem-se anticorpos monoclonais de murganho contra a P-selectina, reactivos com plaquetas activadas. Geng J. G. *et al.* (*J. Biol. Chem.*, **266** (1991) 22313-22318) descrevem anticorpos monoclonais de murganho que se ligam a um fragmento de aminoácidos de P-selectina (aa), o fragmento de aa 60-75 (Cys a Glu, contado de acordo com a sequência P16109 da Swiss-Prot que inclui a sequência de sinal. O WO 93/21.956 refere-se a anticorpos monoclonais de murganho contra a P-selectina e a anticorpos humanizados da subclasse IgG1 que competem com um anticorpo determinado, ligando-se na presença do fragmento de aa 60-75 da P-selectina, e na ausência de íões cálcio. O WO 94/25.067 descreve tanto um anticorpo monoclonal murino anti-P-selectina (anticorpo murino PB 1.3 tal como segregado por uma linha de células designada pelo Número de Acesso da

ATCC, N°. HB 11041) como anticorpos humanizados contra a P-selectina. Nenhum dos anticorpos monoclonais murinos mencionados, contra a P-selectina humana é útil para o tratamento de pacientes humanos. Está em desenvolvimento pré-clínico um anticorpo monoclonal humanizado contra a P-selectina, da subclasse IgG1 humana, mencionado no WO 93/21.956 ([www.mrcctechnology.org](http://www.mrcctechnology.org)).

### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

A invenção diz respeito a anticorpos caracterizados por os referidos anticorpos se ligam a P-selectina, não se ligam ao factor de complemento humano C1q e não se ligam ao receptor Fc $\gamma$  humano em células NK. Os anticorpos da invenção contêm uma parte Fc derivada de uma origem humana, e são caracterizados por estes anticorpos pertencerem à subclasse humana IgG4, em que o S228 se encontra substituído por P e o L235 se encontra substituído por E, e por inibirem a adesão das células HL60 semelhantes a leucócitos a P-P-selectina purificada, com um valor de IC<sub>50</sub> de entre 0,08 e 0,5  $\mu$ g/mL, e por incluírem as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 do domínio variável da cadeia leve definida pela sequência de aminoácidos SEQ ID N°3, bem como as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 do domínio variável da cadeia pesada definida pela SEQ ID N°3. Preferivelmente estes anticorpos são anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. Os anticorpos têm propriedades novas e inventivas originando benefícios em pacientes que sofram de patologias inflamatórias e trombótica, em particular de doença

oclusiva arterial periférica (PAOD) e de isquémica crítica de membros (CLI).

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Fig. 1 mostra que os anticorpos da invenção inibem a adesão de células HL60 semelhantes a leucócitos a P-selectina purificada revestida sobre placas de microtitulação. Os anticorpos mutados são mais potentes do que o anticorpo de partida, não mutado.

A Fig. 2 mostra a actividade inibidora dos anticorpos da invenção no ensaio de rosetas medindo a adesão de plaquetas activadas por trombina a células HL60.

As Figs. 3a e 3b representam a reactividade cruzada dos anticorpos da invenção em relação a P selectina de rato e de cinomólogo. Na Fig.3a: Os anticorpos anti P-selectina não afectam a adesão de plaquetas de rato activadas por trombina a células HL60, enquanto o anticorpo monoclonal comercialmente disponível anti-P-selectina (Pharmingen 09361A) inibe esta interacção. Na Fig. 3b: Os anticorpos da invenção inibem a adesão de plaquetas de cinomólogo activadas a células HL60.

As Fig. 4a - c demonstram a selectividade dos anticorpos para a P-selectina em relação às E-selectina e L-selectina representada por curvas de ligação selectiva para transfectantes de P-selectina, E-selectina e L-



selectina. Os anticorpos consoante a invenção ligam-se a P-selectina de células CHO com valores de EC<sub>50</sub> na gama de entre 0,01 e 0,07 µg/mL. Os valores de EC<sub>50</sub> para a E-selectina e para a L-selectina das células CHO 300.19 são preferivelmente maiores do que 100 µg/mL.

A Fig. 5 representa a actividade inibidora dos anticorpos da invenção num sistema de fluxo completamente humano. Eles inibem a adesão de leucócitos humanos a uma monocamada de plaquetas de um modo dependente da concentração, a uma taxa de corte de 65/s.

A Fig. 6 representa o efeito de inibição dos anticorpos da invenção sobre a adesão de leucócitos a células endoteliais humanas expressando a P-selectina. A Fig. 6a demonstra a inibição total da adesão de leucócitos em % do controlo, a Fig. 6b mostra de uma forma representativa o efeito inibidor de um dos anticorpos sobre o número absoluto dos diferentes subconjuntos de leucócitos.

## **DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO**

### **I. Definições**

O termo "P-selectina" refere-se a uma proteína de 140 kDa expressa por plaquetas e por células endoteliais humanas, tal como foi descrito por Hsu-Lin *et al.*, J. Biol. Chem. **259**: 9121 (1984), e por Mc Ever *et al.*, J. Clin.

Invest. **84**: 92 (1989). Esta glicoproteína transmembranar de tipo I é constituída por um domínio de lectina no terminal NH<sub>2</sub>, seguido por um domínio do tipo do de um factor de crescimento do endotélio (EGF) e nove domínios de repetições de consenso. Está ancorada à membrana por um único domínio transmembranar e contém uma pequena cauda citoplásmica. São descritos anticorpos, que são capazes de inibir uma ou mais das actividades biológicas mediadas pela P-selectina, por exemplo, a sua actividade anti-inflamatória ou anti-trombótica. Os anticorpos ligam-se à P-selectina e actuam interferindo com a ligação da P-selectina ao seu ligando.

O termo "ligando de P-selectina" diz respeito de preferência ao ligando de elevada afinidade e relevância biológica da P-selectina, tal como a glicoproteína do tipo de mucina ligando de P-selectina, a glicoproteína-1 (PSGL-1), tal como foi descrita por Moore *et al.*; J. Cell. Biol. **118**: 2445 (1992), Sako *et al.*, Cell **75**: 1179 (1993). A PSGL-1 é uma proteína de membrana de tipo I com um domínio extracelular rico em serinas, treoninas, e prolinas, incluindo uma série de repetições decaméricas ligadas a aglomerados de O-glicanas sialiladas. Encontra-se normalmente expressa sob a forma de um homodímero com duas subunidades ligadas por dissulfureto, com massas moleculares relativas de cerca de 120 kDa, em leucócitos circulantes. O local de ligação da P-selectina está localizado no extremo da parte do terminal NH<sub>2</sub> da PSGL-1. A sialomucina GPIb $\alpha$  que é expressa por plaquetas e apresenta

semelhanças estruturais à PSGL-1 foi recentemente demonstrada como sendo um ligando para a P-selectina em plaquetas (Romo *et al.*, J. Exp. Med. **190**: 803 (1999)). As consequências biológicas da ligação de GPIIb/IIIa à P-selectina ainda estão a ser investigadas, mas a interação, no entanto, contribui provavelmente para o rolamento e para a aderência das plaquetas a células endoteliais activadas (Berndt *et al.*, Thromb. Haemost. **86**: 178 (2001)). A P-selectina também se liga com uma pequena afinidade a pequenos oligossacáridos sialados, fucosilados, tais como o sialil Lewis x (Foxall *et al.*, J. Cell. Biol. **117**: 895 (1992), Varki, Curr. Opin. Cell. Biol. 257 (1992) e a hidratos de carbono sulfatados específicos, tais como o sulfato de heparina (McEver *et al.*, J. Biol. Chem. **270**: 11025 (1995)).

O termo "anticorpo" inclui as diversas formas de anticorpos, preferivelmente anticorpos monoclonais, incluindo mas não se limitando a, anticorpos inteiros, fragmentos de anticorpo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos obtidos por engenharia genética (anticorpos variantes ou mutantes), desde que as suas propriedades características de acordo com a invenção sejam mantidas. São particularmente preferidos os anticorpos monoclonais humanos ou humanizados, em particular sob a forma de anticorpos humanos recombinantes.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal", tal como se utilizam neste documento, referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpo com uma única composição em aminoácidos.

O termo "anticorpo quimérico" refere-se a um anticorpo monoclonal incluindo uma região variável, isto é, uma região de ligação, entre uma fonte ou espécie e pelo menos uma parte de uma região constante derivada de uma fonte ou espécie diferente, em geral preparada por técnicas de ADN recombinante. São especialmente preferidos os anticorpos quiméricos incluindo uma região variável murina e uma região constante humana. Estes anticorpos quiméricos murinos/humanos são produzidos por expressão de genes de imunoglobulina que incluem segmentos de ADN codificando para regiões variáveis de imunoglobulina murina e segmentos de ADN codificando para regiões constantes de imunoglobulina humana. Outras formas de "anticorpos quiméricos" incluídas neste documento são aquelas em que a região constante foi modificada ou alterada a partir da do anticorpo original para gerar as propriedades descritas neste documento, em particular a respeito da ligação a C1q e/ou ao receptor Fc (FcR). Estes anticorpos "quiméricos" também são referidos como "anticorpos com alteração de classe". Incluem-se nos métodos para a produção de anticorpos quiméricos, as técnicas de transfecção recombinantes convencionais de ADN e as técnicas de transfecção de genes que são hoje em dia parte integrante do estado da técnica. Vejam-se, por exemplo, Morrison,

S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81** (1984) 5851-6855; Patentes US N<sup>os</sup>. 5.202.238 e 5.204.244.

O termo "anticorpo humanizado" refere-se a anticorpos nos quais o quadro de referência ou "regiões determinantes da complementaridade" (CDR) foi modificado para incluir o CDR de uma imunoglobulina com uma especificidade diferente, em comparação com a da imunoglobulina de que provêm. Numa concretização preferida, enxerta-se uma CDR murina na região do quadro de um anticorpo humano para se preparar o "anticorpo humanizado". Vejam-se, por exemplo, Riechmann, L., *et al.*, Nature **332** (1988) 323-327; e Neuberger, M.S., *et al.*, Nature **314** (1985) 268-270. As CDR especialmente preferidas correspondem às que representam sequências que reconheçam os antígenos referidos acima para anticorpos quiméricos e bifuncionais. Outras formas de "anticorpos humanizados" incluídas neste documento são aquelas nas quais a região foi modificada ou alterada a partir da do anticorpo original para gerar as propriedades que se descreveram acima neste documento, em particular no que toca à ligação a C1q e/ou ao receptor Fc (FcR).

O termo "anticorpo humano", tal como se utiliza neste documento, pretende incluir anticorpos com regiões constantes e variáveis derivadas das sequências de imunoglobulina da linha do gérmen humano. Os anticorpos humanos são bem conhecidos no estado da técnica (van Dijk e van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. **5**: 368 (2001). Também

se podem produzir anticorpos humanos em animais transgênicos (por exemplo em murganhos) que são capazes, quando imunizados, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção endógena de imunoglobulina. A transferência do dispositivo de genes da linha das imunoglobulinas do gérmen humano nesses murganhos da linha de gérmen resultará na produção de anticorpos humanos quando existir uma provocação com antigénio (vejam-se, por exemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 2551-2555 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, **362**: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., **7**: 33 (1993)). Também se podem produzir anticorpos humanos em bibliotecas de apresentação de fagos (Hoogenboom e Winter, J. Mol. Biol., **227**: 381 (1992); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., **222**: 581 (19991)). As técnicas de Cole *et al.* e de Boerner *et al.* também se encontram disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) e Boerner *et al.*, J. Immunol., **147**(1): 86-95 (1991)). Tal como já se mencionou para os anticorpos quiméricos e humanizados descritos neste documento, o termo "anticorpo humano", tal como se utiliza neste documento, também inclui anticorpos tais como os modificados na região constante para gerar as propriedades descritas neste documento, em particular no tocante à ligação a Clq e/ou à ligação a FcR. Além disto descrevem-se neste documento anticorpos humanos que se ligam a Clq e/ou a FcR. Estes anticorpos humanos são caracterizados por uma elevada selectividade para a P-selectina em relação à E-selectina e à L-selectina. Estes

anticorpos consoante a invenção ligam-se à P-selectina expressando células com valores de **EC<sub>50</sub>** na gama de entre 0,01 e 0,07 µg/mL. Os valores de EC<sub>50</sub> para as células que expressem E-selectina e L-selectina são preferivelmente maiores do que 100 µg/mL. Estes anticorpos são preferíveis e úteis como intermediários para o fabrico de anticorpos humanos com as propriedades descritas neste documento.

O termo "anticorpo recombinante humano", tal como se utiliza neste documento, pretende incluir todos os anticorpos humanos que forem preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de uma célula hospedeira tal como uma célula NSO ou CHO, ou de um animal (por exemplo um murganho) que seja transgénico para os genes de imunoglobulina humanos, ou anticorpos expressos utilizando um vector de expressão recombinante transfectado numa célula hospedeira. Estes anticorpos recombinantes humanos têm regiões constantes e variáveis sob uma forma transposta. Os anticorpos recombinantes humanos de acordo com a invenção foram submetidos a uma permutação somática *in vivo*. Deste modo, as sequências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, enquanto derivam de e se relacionam com as sequências de VH e de VL da linha de gérmen humano, podem não existir na natureza no reportório da linha de anticorpos de gérmen humano *in vivo*.

A "região variável" (região variável de uma cadeia leve (VL), região variável de uma cadeia pesada

(VH)), tal como se utiliza neste documento, denota ambas as cadeias do par de leve e pesada, que está directamente envolvida na ligação do anticorpo ao antigénio. Os domínios das cadeias variáveis leve e pesada humanas possuem a mesma estrutura geral e cada um destes domínios inclui quatro regiões quadro (FR) cujas sequências são largamente conservadas, ligadas por três "regiões hipervariáveis" (ou regiões de determinação de complementaridade, CDR). As regiões do quadro adoptam uma conformação em folha- $\beta$  e as CDR podem formar ansas que ligam as estruturas em folha- $\beta$ . As CDR de cada cadeia são mantidas na sua estrutura tridimensional pelas regiões do quadro e formam em conjunto com as CDR da outra cadeia o local de ligação ao antigénio. As regiões CDR3 da cadeia leve e da pesada do anticorpo desempenham um papel especialmente importante na especificidade/afinidade de ligação dos anticorpos descritos neste documento e portanto proporcionam mais um objecto descrito neste documento.

Os termos "região hipervariável" ou "porção de ligação ao antigénio de um anticorpo", quando utilizados neste documento, referem-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antigénio. A região hipervariável inclui resíduos de aminoácidos das "regiões determinantes da complementaridade" ou "CDR". As regiões do "quadro" ou "FR" são as regiões do domínio variável para além dos resíduos da região hipervariável, tal como definidos neste documento. Portanto, as cadeias leve e pesada de um



anticorpo incluem, do terminal N ao C, os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, e FR4. Em particular, a CDR3 da cadeia pesada é a região que contribui mais para a ligação ao antigénio. As regiões CDR e FR são determinadas de acordo com a definição padrão de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, M. (1991)) e/ou os resíduos de uma "ansa hipervariável".

O termo "ácido nucleico ou molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza neste documento, pretende incluir moléculas de ADN e moléculas de ARN. Uma molécula de ácido nucleico pode ter uma única cadeia ou duas cadeias, mas preferivelmente será ADN de dupla cadeia.

O ácido nucleico está "ligado operacionalmente" quando está colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, o ADN para uma pré-sequência ou líder de secreção está operacionalmente ligado ao ADN para um polipéptido quando estiver expresso sob a forma de uma pré-proteína que participe na secreção do polipéptido; um promotor ou um incrementador está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação caso afecte a transcrição da sequência; ou um local de ligação de um ribossoma está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação quando se encontra posicionado de modo a facilitar a tradução. Em geral, "ligado operacionalmente" significa que as sequências de ADN que se estão a ligar são contíguas, e, no caso de um líder de

secreção, contíguas e na fase de leitura. No entanto, os incrementadores não necessitam de ser contíguos. Conseguise a ligação por uma ligação em locais de restrição convenientes. Caso não existam locais destes, utilizam-se os adaptadores ou elos de ligação sintéticos oligonucleotídicos de acordo com a prática convencional.

Tal como se utilizam neste documento, as expressões "célula", "linha de células", e "cultura de células" são utilizadas de modo intercambiável e todas estas designações incluem a prole. Portanto, as palavras "transformantes" e "células transformadas" incluem a célula que é o sujeito primário bem como as culturas que dela se derivarem sem se considerar o número de transferências. Também é entendido que toda a prole pode não ser exactamente idêntica no seu conteúdo em ADN, devido a mutações deliberadas ou ocasionais. Está incluída a prole variante que tenha a mesma função ou actividade biológica que se despistou na célula originalmente transformada. Quando se pretendam designações distintas, tal facto será claro a partir do contexto.

Os "domínios constantes" não estão directamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antigénio, mas eles exibem diversas funções efectivadoras. Consoante a sequência de aminoácidos da região constante das suas cadeias pesadas, os anticorpos ou imunoglobulinas estão repartidos pelas classes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e diversas destas podem ainda dividir-se em subclasses

(isotipo), por exemplo IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, IgA1 e IgA2. As regiões constantes da cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são denominadas respectivamente  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\mu$ . Os anticorpos descritos neste documento são preferivelmente do tipo IgG.

A parte Fc de um anticorpo está directamente envolvida na activação do complemento, na ligação a C1q e na ligação ao receptor Fc. Enquanto a influência de um anticorpo sobre o sistema complemento depende de determinadas condições, a ligação a C1q é provocada por locais de ligação definidos na parte Fc. Estes locais de ligação são conhecidos no estado da técnica e estão descritos por exemplo por Boakle *et al.*, *Nature* **282** (1975) 742-743, Lukas *et al.*, *J. Immunol.* **127** (1981) 2555-2560, Brunhouse e Cebra, *Mol. Immunol.* **16** (1979) 907-917, Burton *et al.*, *Nature* **288** (1980) 338-344, Thommesen *et al.*, *Mol. Immunol.* **37** (2000) 995-1004, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* **164** (2000) 4178-4184, Hezareh *et al.*, *J. Virology* **75** (2001) 12161-12168, Morgan *et al.*, *Immunology* **86** (1995) 319-324, EP 0 307.434. Estes locais de ligação são por exemplo L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 e P329 (numeração de acordo com o índice EU DE Kabat, veja-se adiante). Os anticorpos das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 apresentam em geral activação do complemento e ligação a C1q e a C3, enquanto os IgG4 não activam o sistema do complemento e não se ligam a C1q nem a C3. Tal como se utiliza neste documento, o termo "parte Fc derivada de uma origem humana" denota uma parte de Fc que é quer uma parte Fc de um

anticorpo humano, um anticorpo da subclasse IgG4 ou uma parte de Fc de um anticorpo humano da subclasse IgG1, IgG2 ou IgG3 que está modificada de uma forma tal que não se consegue detectar qualquer ligação a Clq nem a FcR, tal como se define adiante. Uma "parte Fc de um anticorpo" é um termo bem conhecidos dos especialistas da técnica, que se define com base na clivagem de anticorpos por papaína. Os anticorpos consoante a invenção contêm a título de parte Fc uma parte Fc derivada de uma origem humana e preferivelmente todas as outras partes das regiões constantes humanas. Preferivelmente a parte Fc é uma parte Fc humana e é particularmente preferido que seja da subclasse humana IgG4.

As partes Fc e regiões constantes da cadeia pesada mais preferidas são exibidas na SEQ ID NO: 28.

## **II. Concretizações Preferidas da Invenção**

O anticorpo de acordo com a invenção caracteriza-se de preferência por a sequência de aminoácidos CDR3 da região variável da cadeia pesada do anticorpo referido ser a sequência de aminoácidos CDR3 da cadeia pesada com a SEQ ID NO: 39.

O anticorpo de acordo com a invenção inclui preferivelmente uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável, caracterizadas por a cadeia variável pesada conter as sequências CDR, CDR1, CDR2 e CDR3 e por a CDR1

ser a SEQ ID NO: 30, a CDR2 ser a SEQ ID NO: 34 e a CDR3 ser a SEQ ID NO: 39, em que as CDR referidas sejam seleccionadas independentemente umas das outras.

O anticorpo de acordo com a invenção é caracterizado preferivelmente por a cadeia leve variável conter as sequências CDR, CDR1, CDR2 e CDR3, e por a CDR1 ser a SEQ ID NO: 43, a CDR2 ser a SEQ ID NO: 45 e a CDR3 ser a SEQ ID NO: 48, em que todas as CDR sejam seleccionadas independentemente umas das outras.

O anticorpo é preferivelmente caracterizado por as CDR da cadeia pesada serem as CDR com a SEQ ID NO: 4 e as CDR da cadeia leve serem as CDR com a SEQ ID NO: 3.

As sequências CDR: podem ser determinadas de acordo com a definição padrão de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). As CDR em cada cadeia estão separadas por aminoácidos do quadro. As CDR da SEQ ID NO: 1-22 descritas neste documento nas SEQ ID NO: 29-52.

O anticorpo de acordo com a invenção é preferivelmente caracterizado pelo facto de o anticorpo referido se ligar à P-selectina e incluir uma região variável da cadeia pesada e uma da cadeia leve, seleccionadas respectivamente de entre o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ

ID NO: 4 e de entre o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3. Também são descritos anticorpos caracterizados por estes anticorpos se ligarem a P-selectina e por incluírem uma região variável da cadeia pesada e uma da região variável da cadeia leve seleccionadas independentemente de entre o conjunto constituído por:

a) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 2 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1;

b) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 6 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 5;

c) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 8 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 7;

d) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 10 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 9;

e) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 12 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 11;

f) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 14 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 13;

g) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 16 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 15;

h) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 17;

i) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 20 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 19; e

j) o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22 e o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 21.

Caracteriza-se preferivelmente o anticorpo de acordo com a invenção por a região variável da cadeia pesada incluir uma sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 4.

Caracteriza-se preferivelmente o anticorpo de acordo com a invenção por a região variável da cadeia leve incluir uma sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 3.

Os anticorpos que se ligam à P-selectina e não se ligam ao factor complemento C1q e/ou aos receptores Fc são descritos neste documento. Estes anticorpos não originam citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC). Preferivelmente, os anticorpos são caracterizados por se ligarem a P-selectina, por conterem uma parte Fc derivada de origem humana e por não se ligarem ao factor complemento C1q. Mais preferivelmente, estes anticorpos são anticorpos humanos ou humanizados.

O anticorpo descrito neste documento é preferivelmente caracterizado por as suas cadeias constantes serem de origem humana. Tais cadeias constantes são bem conhecidas no estado da técnica e elas foram descritas por exemplo por Kabat (veja-se por exemplo Johnson, G., e Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* **28** (2000) 214-218). Por exemplo, uma região constante de uma cadeia



pesada humana útil inclui uma sequência de aminoácidos como a da SEQ ID NO: 28.

Por exemplo, uma região constante de uma cadeia *kappa*-leve humana útil inclui uma sequência de aminoácidos como a da SEQ ID NO: 23.

As funções efectivadoras mediadas pela parte Fc da região Fc do anticorpo referem-se a funções efectivadoras que operam depois da ligação de um anticorpo a um antigénio (estas funções envolvem a activação da cascata complemento e/ou a activação da célula por um receptor Fc (FcR)).

Pode avaliar-se a função da cascata complemento pelo ensaio CH<sub>50</sub>. Adicionam-se células vermelhas de ovino sensibilizadas com anticorpos anti-vermelhos (EA) a soro do teste, para activar o caminho clássico de que resulta a hemólise. O volume de soro necessário para lisar 50 % das células vermelhas determina a unidade CH<sub>50</sub>. O AP-CH<sub>50</sub> mede os caminhos alternativa e terminal. O processo é similar excepto que se utilizam células vermelhas de coelho. O caminho alternativo é activado após a adição do soro do teste.

A C1q e duas proteases de serina, C1r e C1s, formam o complexo C1, primeira componente do caminho da citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Para activar a cascata do complemento, a C1q liga-se a pelo

menos duas moléculas de IgG1 ou a uma molécula de IgM, ligada ao alvo antigénico (Ward e Ghetie, *Therapeutic Immunology* **2**: 77-94 (1995)). Burton descreveu (Molec. Immunol., **22**(3): 161-206 (1985)) que a região da cadeia pesada que inclui os resíduos de aminoácido 318 e 337 está envolvida na fixação do complemento. Duncan e Winter (Nature **332**: 738-40 (1988)), utilizando mutagénese dirigida ao local, reportaram que Glu318, Lys320 e Lys322 formam o local de ligação a C1q. O papel dos resíduos Glu318, Lys320 e Lys 322 na ligação a C1q foi confirmado pela capacidade de um péptido sintético curto contendo estes resíduos, para inibir a lise mediada pelo complemento.

O termo "citotoxicidade dependente do complemento (CDC)" refere-se à lise de células endoteliais humanas que expressem P-selectina bem como de plaquetas, pelo anticorpo de acordo com a invenção, na presença de complemento. Mede-se preferivelmente a CDC por tratamento de células endoteliais humanas expressando P-selectina e plaquetas, com um anticorpo de acordo com a invenção, na presença de complemento. Marcam-se preferivelmente as células com calceína. Observa-se CDC quando o anticorpo induz a lise de 20 % ou mais das células alvo, a uma concentração de 30 µg/mL. No entanto, verificou-se que para as propriedades dos anticorpos descritos neste documento, é essencial uma menor ligação ao factor de complemento C1q num ensaio ELISA. Num tal ensaio, em princípio, reveste-se uma placa de ELISA com uma gama de concentrações do anticorpo, e adiciona-se-lhe C1q humano purificado ou soro humano.

Detecta-se a ligação a C1q com um anticorpo dirigido contra C1q seguido por um conjugado marcado com peroxidase. Mede-se a detecção de ligação (ligação máxima  $B_{max}$ ) como a densidade óptica a 405 nm ( $DO_{405}$ ) para o substrato da peroxidase, ABTS (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (6)]. De acordo com a invenção presente ela refere-se a um anticorpo, caracterizado pela não ligação do anticorpo a um factor de complemento C1q referindo-se a uma tal medição por um ensaio ELISA no qual a ligação máxima ( $B_{max}$ ) de C1q ao anticorpo a uma concentração de 10 µg/mL do anticorpos  $\leq 30$  % do  $B_{max}$  do anticorpo LC 1004-002 da linha celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641). Preferivelmente 20 % ou menos.

Também se prefere além disto, que um anticorpo descrito neste documento demonstre uma menor ligação ao factor de complemento C3 num ensaio ELISA. O ensaio é levado a cabo do mesmo modo que o ensaio para C1q. Num tal ensaio, em princípio, reveste-se a placa de ELISA com gamas de concentração do anticorpo, ao qual se adiciona C3 humano purificado ou soro humano. Detecta-se a ligação a C3 com um anticorpo dirigido contra C3 e em seguida um conjugado marcado com peroxidase. Mede-se a detecção da ligação (ligação máxima  $B_{max}$ ) sob a forma da densidade óptica a 405 nm ( $DO_{405}$ ) para o substrato da peroxidase, ABTS (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina-sulfonato (6)]. Deste modo a descrição refere-se a um anticorpo, caracterizado pela não ligação do anticorpo ao factor de complemento C3 referido num tal ELISA, ensaio de medição no qual a ligação máxima

( $B_{max}$ ) de C3 ao anticorpo a uma concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$  do anticorpo seja 10 % do  $B_{max}$  do anticorpo LC 1004-002 da linha de células hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641), preferivelmente 5 % ou menos.

O termo "citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC)" é uma função mediada pela ligação ao receptor Fc e refere-se à lise de células alvo expressando P-selectina por parte de um anticorpo descrito neste documento na presença de células efectivadoras. A ADCC é preferivelmente medida pelo tratamento de uma preparação de células endoteliais expressando P-selectina com um anticorpo de acordo com a invenção, na presença de células efectivadoras tais como as PBMC isoladas de fresco (células mononucleares de sangue periférico) ou células efectivadoras das pastilhas de centrifugação, tais como monócitos ou células assassinas naturais NK (assassinas naturais). Marcam-se as células alvo com  $^{51}\text{Cr}$  e em seguida incubam-se com os anticorpos. Incubam-se as células marcadas com células efectivadoras e analisa-se no sobrenadante a quantidade de  $^{51}\text{Cr}$  libertado. Inclui-se nos controlos o da incubação das células endoteliais alvo com as células efectivadoras, mas sem o anticorpo. Determinou-se a capacidade dos anticorpos para induzir os passos iniciais mediando a ADCC, medindo a sua ligação a células que exprimiam receptores Fc $\gamma$ , tais como os granulócitos (que expressam Fc $\gamma$ RII e RIII), as células NK (que expressam Fc $\gamma$ RIII) e os monócitos (que expressam Fc $\gamma$ RI e RII).

Podem mediar-se as funções de ligação a receptores Fc através da interacção da região Fc de um anticorpo com os receptores Fc (FcR), que são receptores especializados da superfície das células nas células hematopoiéticas. Os receptores Fc pertencem à superfamília das imunoglobulinas, e tem sido demonstrado que mediam tanto a remoção de patogénicos revestidos a anticorpo, por fagocitose dos complexos imunológicos, como a lise dos eritrócitos e de diversos outros alvos celulares (por exemplo células tumorais) revestidos com o anticorpo correspondente, através de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC). Van de Winkel e Anderson, *J. Leuk. Biol.* **49**: 511-24 (1991). Definem-se os Fc através da sua especificidade para isotipos de imunoglobulina; referem-se os receptores Fc para anticorpos IgG como Fc $\gamma$ R, para IgE como Fc $\epsilon$ R, para IgA como Fc $\alpha$ R e assim por diante. A ligação a receptores Fc está descrita por exemplo em Ravetch e Kinet, *Ann. Rev. Immunol.* **9** (1991) 457-492, Capel *et al.*, *Immunomethods* **4** (1994) 32-34, de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* **126** (1995) 330-341 e Gessner *et al.*, *Ann. Hematol.* **76** (1998) 231-248. Os anticorpos descritos neste documento mostram de preferência uma ligação diminuída a receptores Fc $\gamma$ , preferivelmente Fc $\gamma$ RI, -IIA, -IIB, e/ou IIIA.

Os anticorpos descritos neste documento preferivelmente não originam nenhuma função efectivadora e não se ligam ao Fc $\gamma$ R apresentado sobre as células NK. O

termo "nenhuma ligação a FcγR" significa portanto que a uma concentração de anticorpo de 10 µg/mL a ligação de um anticorpo de acordo com a invenção a células NK é de 1 % ou menos da ligação que se encontra para o anticorpo LC 1004-002 da linha de células hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641).

Enquanto o IgG4 denota uma menor ligação a FcR, os anticorpos das subclasses de IgG denotam uma forte ligação. No entanto os resíduos Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (perda de hidrato de carbono Fc), Pro329 e 234, 235, 236 e 237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, e His435 são resíduos que proporcionam, quando alterados também uma menor ligação a FcR (Shields *et al.* J. Biol. Chem. **276** (2001), 6591-6604, Lund *et al.* FASEB J. **9** (1995), 115-119, Morgan *et al.* Immunology **86** (1995) 319-324, EP 0 307.434). Preferivelmente um anticorpo descrito neste documento a respeito de uma ligação de FcR à subclasse IgG4 com uma mutação no S228, e/ou no L235.

São especialmente preferidas as mutações S228P (IgG4) e/ou L235E (IgG4). As combinações preferidas de mutações também estão listadas na tabela 1.

O termo "ligando-se a P-selectina", tal como se utiliza neste documento, significa a ligação do anticorpo a P-selectina quer num ensaio BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia) ou num ELISA no qual se reveste quer

P-selectina purificada, quer transfectantes de P-selectina em CHO em placas de microtitulação.

No ensaio BIAcore verifica-se que o anticorpo está ligado a uma superfície e mede-se a ligação da P-selectina por Ressonância do Plasmão Superficial (SPR). A afinidade da ligação é definida pelos termos  $k_a$  (constante de velocidade para a associação do anticorpo do complexo anticorpo/antígeno),  $k_d$  (constante de dissociação), e  $K_D$  ( $k_d/k_a$ ). Os anticorpos descritos neste documento apresentam valores de  $K_D$  de  $10^{-8}$  ou menos, preferivelmente de entre  $10^{-11}$  e  $10^{-9}$  M (vejam-se os exemplos). Deste modo, a descrição refere-se a um anticorpo talo como se descreveu acima, em que o anticorpo se liga a P-selectina com um valor de  $K_D$  menor ou igual a  $10^{-8}$  M num ensaio BIAcore, preferivelmente em que a gama de  $K_D$  seja de entre  $10^{-11}$  e  $10^{-9}$  M.

Preferivelmente, o anticorpo é do subtipo IgG4 humano.

Mais preferivelmente, o anticorpo é caracterizado de tal forma que o anticorpo seja um anticorpo humano da subclasse IgG4, contendo pelo menos uma mutação no L235 e no S228 (numeração de acordo com o índice EU).

No ELISA específico para P-selectina, revestem-se com P-selectina purificada placas de microtitulação e detecta-se a ligação do anticorpo à P-selectina com um IgG biotinilado anti-humano e os passos habituais do ELISA. Os

valores de  $EC_{50}$  neste ensaio variam preferivelmente adentro da gama de entre 0,002 e 0,03  $\mu\text{g/mL}$  nas células CHO com P-selectina, isto é, a invenção presente refere-se a anticorpos, nos quais os valores de  $EC_{50}$  para a ligação a P-selectina estejam adentro da gama de entre 0,002 e 0,03  $\mu\text{g/mL}$  nas células CHO que apresentam P-selectina, num ensaio ELISA. Num ensaio no qual os transfectantes CHO expressando P-selectina tenham sido utilizados como revestimento da placa de microtitulação, os valores de  $EC_{50}$  variam entre 0,01 e 0,08  $\mu\text{g/mL}$ , preferivelmente entre 0,01 e 0,04  $\mu\text{g/mL}$ .

Os valores de  $EC_{50}$  para os transfectantes com a E-selectina e com a L-selectina são preferivelmente maiores do que 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os anticorpos da invenção são caracterizados por se ligarem pelo menos 1.000 vezes mais especificamente a P-selectina do que a E-selectina e/ou a L-selectina, tal como se pode medir pelos valores correspondentes de  $EC_{50}$  num ensaio ELISA, em que se utilizem P-selectina e E-selectina, e/ou P-selectina e L-selectina, como revestimentos da placa de microtitulação.

O termo "inibir a ligação do ligando da P-selectina à P-selectina", tal como se utiliza neste documento, refere-se à ligação da P-selectina purificada ou expressa em células ao seu ligando apresentado em células HL60. A ligação da P-selectina ao seu ligando é inibida pelos anticorpos descritos neste documento. Mede-se a inibição sob a forma de valor de  $IC_{50}$  em ensaios *in vitro*



de análise da capacidade do anticorpo para inibir a ligação da P-selectina a um ligando. Estes ensaios estão descritos nos Exemplos. Eles recorrem, a título de fontes adequadas de P-selectina, a P-selectina purificada por afinidade e a plaquetas activadas, bem como a fontes adequadas do ligando sob a forma de células semelhantes a leucócitos, tais como células HL60. Nestes ensaios, a adesão a células HL60, que expressam PSGL-1 a título de ligando fisiologicamente relevante da P-selectina, a P-selectina ou a plaquetas activadas, é medida sem anticorpo com concentrações crescentes de anticorpo. Os valores de  $IC_{50}$  são medidos como valores médios de pelo menos três medições independentes. Inibir significa um valor de  $IC_{50}$  não superior a 1  $\mu\text{g/mL}$ , preferivelmente de entre 0,5 e 0,08  $\mu\text{g/mL}$ .

Os anticorpos descritos neste documento inibem a adesão de células HL60 semelhantes a leucócitos a P-selectina purificada, com valores de  $IC_{50}$  da ordem de entre 0,08 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , preferivelmente de entre 0,08 e 0,11  $\mu\text{g/mL}$ . A adesão de célula HL60 semelhantes a leucócitos a plaquetas activadas é inibida com valores de  $IC_{50}$  da ordem de entre 0,05 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$ .

Deste modo, concretizações adicionais referidas neste documento referem-se a anticorpos, caracterizados por os valores de  $EC_{50}$  para a sua ligação a P-selectina ser de entre 0,01 e 0,08  $\mu\text{g/mL}$  num ensaio ELISA no qual se reveste a placa de microtitulação com transfectantes CHO quer

expressem P-selectina. A gama preferida é de entre 0,01 e 0,04 µg/mL. Os valores de EC<sub>50</sub> para os transfectantes com E-selectina e com L-selectina são maiores do que 100 µg/mL. Numa concretização adicional os anticorpos da invenção presente inibem a adesão de células HL60 semelhantes a leucócitos a P-selectina purificada, com valores de IC<sub>50</sub> de entre 0,08 e 0,5 µg/mL. A gama preferida é de entre 0,08 e 0,11 µg/mL.

Os anticorpos descritos neste documento inibem a interacção de leucócitos com uma monocamada de plaquetas, preferivelmente em mais do que 70 %, num sistema de fluxo completamente humano (a uma concentração de 10 µg/mL). Além disto, estes anticorpos inibem a adesão de leucócitos a células endoteliais activadas num sistema de fluxo humano na gama de entre 60-90 %, a uma concentração de cerca de 3 µg/mL (com efeitos diferenciais sobre os subtipos de leucócitos).

Os anticorpos descritos neste documento são preferivelmente capazes de se ligarem a P-selectina na presença do fragmento de P-selectina com os aminoácidos 60-75 (sequência Swiss-Prot P16109) e/ou não inibem competitivamente a ligação de um anticorpo segregado por uma linha de células designada pelo seu Número de Acesso ATCC, HB11041, à P-selectina.

Os anticorpos descritos neste documento preferivelmente não inibem a interacção da P-selectina com

a glicoproteína da membrana das plaquetas GPIb $\alpha$ , num formato de ensaio ELISA. Num ELISA de glicocalicina, imobilizou-se a porção extracelular solúvel de GPIb $\alpha$  sobre as paredes de placas de microtitulação, tal como foi descrito (Romo *et al.*, J. Exp. Med. **190**: 803 (1999), e detectou-se a ligação a P-selectina purificada depois de uma incubação prévia com os HuMabs de P-selectina, utilizando um anticorpo policlonal anti-P-selectina.

Em mais uma concretização preferida que se descreve neste documento, o anticorpo, caracterizado por não se ligar à proteína C3, é mais preferivelmente caracterizado por não originar citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Além disto, o anticorpo pode ser caracterizado por não se ligar a receptores Fc $\gamma$  nas células efectivadoras NK. Preferivelmente, o anticorpo é caracterizado por ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana, contendo pelo menos uma mutação em L235 e em S228 (numeração de acordo com o índice EU). Numa concretização preferida adicional, caracteriza-se o anticorpo por não originar citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC).

Numa concretização ainda mais preferida, os anticorpos descritos neste documento são caracterizados por se ligarem a P-selectina e por conterem uma região variável seleccionada independentemente de entre o conjunto constituído por

a) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:1 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:2;

b) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:3 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:4;

c) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:5 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:6;

d) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:7 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:8;

e) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:9 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:10;

f) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:11 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:12;

g) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:13 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:14;

h) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:15 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:16;

i) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:17 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:18;

j) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:19 e pelo domínio variável da cadeia pesada

definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:20; e

k) o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:21 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:22.

Preferivelmente, os anticorpos incluem o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:3 e pelo domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:4.

Os anticorpos preferidos são caracterizados por estes anticorpos serem da subclasse IgG4 humana.

Estes anticorpos variantes incluem por exemplo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 28.

Um anticorpo "variante" anti-P-selectina é referido neste documento como sendo uma molécula que difere na sua sequência de aminoácidos, de uma sequência de aminoácidos de um anticorpo anti-P-selectina "parente" em virtude da adição, eliminação e/ou substituição de um ou de mais resíduos de aminoácido na sequência do anticorpo "parente", ou de origem. Na concretização preferida, a variante inclui uma ou mais substituições de aminoácidos em

uma ou mais das regiões variáveis ou constantes do anticorpo de origem, preferivelmente na região constante. Por exemplo, a variante pode incluir pelo menos uma, por exemplo entre cerca de uma a cerca de dez, e preferivelmente entre cerca de duas e cerca de cinco, substituições, numa ou em mais regiões variáveis do anticorpo de origem. Habitualmente a variante terá uma sequência de aminoácidos com uma identidade de pelo menos 90 % da sequência de aminoácidos em relação às sequências dois domínios constantes e/ou variáveis do anticorpo de origem, mais preferivelmente pelo menos 95 %, e de preferência pelo menos 99 %.

Define-se neste documento a identidade ou a homologia a respeito desta sequência, como a percentagem dos resíduos de aminoácido na sequência candidata que são idênticos aos resíduos no anticorpo de origem, depois de se alinharem as sequências e de se introduzirem hiatos, caso seja necessário, para se conseguir a percentagem máxima de identidade entre as sequências. Não se devem interpretar nenhuma extensão, eliminações ou inserções no terminal N, no terminal C, ou internas, na sequência do anticorpo, como afectando a identidade ou a homologia da sequência. A variante mantém a capacidade de se ligar a P-selectina humana e preferivelmente tem propriedades que são melhores do que as do anticorpo de origem. Por exemplo, a variante pode exibir uma maior afinidade de ligação, uma maior capacidade para tratar uma doença associada com a isquémia

crítica de um membro ou a doença oclusiva arterial periférica (CLI/PAOD).

A variante de anticorpo com interesse específico neste documento é uma que exhibe uma actividade inibidora pelo menos 4 vezes maior no ensaio de adesão, em comparação com a do anticorpo de origem, por causa da eliminação da ligação aos receptores Fcγ.

O anticorpo "de origem" neste documento é um, que é codificado por uma sequência de aminoácidos utilizada para a preparação da variante. Preferivelmente, o anticorpo de origem possui uma região do quadro humana e, caso esteja presente, tem região ou regiões constantes de anticorpo. Por exemplo, o anticorpo de origem pode ser um anticorpo humanizado ou humano.

Incluem-se nos anticorpos descritos neste documento, além deste, os anticorpos que tenham "modificações conservadoras da sequência", modificações das sequências de nucleótidos e de aminoácidos, que não afectam nem alteram as características acima mencionadas do anticorpo de acordo com a invenção. Podem introduzir-se modificações por técnicas padrão conhecidas, tais como mutagénese dirigida a um local e mutagénese mediada por PCR. Incluem-se nas substituições conservadoras de aminoácidos aquelas em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido que apresente uma cadeia lateral semelhante. Já foram definidas na



técnica as famílias de resíduos de aminoácidos com grupos laterais semelhantes. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo lisina, arginina, histidina), com cadeias laterais ácidas (por exemplo ácido aspártico, ácido glutâmico), com cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), com cadeias laterais não polares (por exemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), com cadeias laterais ramificadas em beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e com cadeias laterais aromáticas (por exemplo tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Deste modo, um resíduo de aminoácido não essencial previsto num anticorpo humano anti-P-selectina pode ser preferivelmente substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeias laterais.

Podem levar-se a cabo as substituições de aminoácidos por mutagénese baseada em modelação molecular tal como foi descrita por Riechmann, L., *et al.*, Nature **332** (1988) 323-327 e por Queen, C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** (1989) 10029-10033.

Em mais uma concretização preferida descrita neste documento, os anticorpos incluem uma região constante  $\kappa$  de cadeia leve, tal como definida pela SEQ ID NO:23.

Os anticorpos preferidos de acordo com a invenção são os anticorpos definidos como IgG4v1 (S228P; L235E).

Em mais uma concretização preferida, estes anticorpos também incluem fragmentos de anticorpos seleccionados de entre o conjunto constituído por Fab, F(ab')<sub>2</sub> e fragmentos de cadeia única.

A invenção também inclui um método para a produção de um anticorpo descrito neste documento incluindo os passos de a) se transformar uma célula hospedeira com uma primeira sequência de ácido nucleico codificando para uma cadeia leve de um anticorpo humano de origem descrito neste documento, e uma segunda sequência de ADN codificando para uma cadeia pesada do referido anticorpo humano de origem, em que a parte Fc seja modificada na medida em que esta parte Fc não se ligue ao factor de complemento Clq e/ou ao receptor Fc; b) expressando as referidas primeira e segunda sequências de ADN de tal modo que sejam produzidas as cadeias leve e pesada do anticorpo referido e c) recuperando o anticorpo referido da célula hospedeira ou da cultura de células hospedeiras.

A descrição também se refere a anticorpos intermediários, isto é a anticorpos anti-P-selectina caracterizados por estes anticorpos serem anticorpos humanos ou humanizados, e se ligarem pelo menos 1.000 vezes mais especificamente à P-selectina do que à E-selectina ou à L-selectina, tal como se pode medir por um ensaio ELISA no qual se reveste a placa de microtitulação com P-selectina e com E-selectina e/ou com P-selectina e com L-

selectina. Preferivelmente, estes anticorpos são anticorpos IgG4. Em particular, estes anticorpos referem-se a anticorpos produzidos por uma linha de células hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641).

Os anticorpos descritos neste documento incluem além disto, anticorpos tais que apresentem "modificações de sequência conservadoras", modificações de sequências de nucleótidos e de aminoácidos, que não afectem nem alterem as características mencionadas acima do anticorpo descrito neste documento. Podem introduzir-se modificações por técnicas habituais já conhecidas, tais como mutagênese dirigida ao local e mutagênese mediada por PCR. Incluem-se nas substituições conservadoras de aminoácidos aquelas em que o resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral semelhante. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo lisina, arginina, histidina), com cadeias laterais ácidas (por exemplo ácido aspártico, ácido glutâmico), com cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), com cadeias laterais não polares (por exemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), com cadeias laterais ramificadas em beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e com cadeias laterais aromáticas (por exemplo tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Deste modo, um resíduo de aminoácido não essencial previsto num anticorpo humano anti-P-selectina pode ser

preferivelmente substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeias laterais.

Podem levar-se a cabo as substituições de aminoácidos por mutagênese baseada em modelação molecular tal como foi descrita por Riechmann, L., *et al.*, *Nature* **332** (1988) 323-327 e por Queen, C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 10029-10033.

A descrição também inclui moléculas de ácido nucleico codificando para um anticorpo mencionado acima, os vectores correspondentes incluindo estes ácidos nucleicos e as células hospedeiras correspondentes para estes vectores. A descrição inclui um método para a preparação dos anticorpos que inclui cultivarem-se as células hospedeiras correspondentes sob condições que permitam a síntese das referidas moléculas de anticorpo e recuperarem-se os referidos anticorpos a partir da cultura referida, por exemplo expressando um ácido nucleico codificando para uma cadeia leve numa célula hospedeira procariótica ou eucariótica e recuperar-se o polipéptido referido a partir da referida célula.

São consideradas as utilizações do anticorpo em diagnóstico e terapêuticas. Numa aplicação em diagnóstico, a descrição descreve um método para se determinar a presença da proteína P-selectina, que inclui expor-se uma amostra que se suspeita conter P-selectina ao anticorpo anti-P-selectina e determinar-se a ligação do anticorpo a esta amostra. Para esta utilização, a descrição proporciona

um estojo que inclui o anticorpo descrito neste documento e instruções para se utilizar o anticorpo na detecção da proteína P-selectina.

Os anticorpos descritos neste documento são úteis para o tratamento das doenças inflamatórias e trombóticas. Incluem-se nestas doenças as patologias vasculares tais como a aterosclerose, a trombose arterial e venosa profunda, a restenose após a angioplastia ou a colocação de stent. As aplicações preferidas são a doença oclusiva arterial periférica (PAOD) e a isquemia crítica de membros (CLI). Outras aplicações são o tratamento das lesões tecidulares pós-isquémicas mediadas por leucócitos e devidas a enfarte do miocárdio, os acontecimentos isquémicos cerebrais (por exemplo apoplexia), o enfarte renal, e outros semelhantes. Os anticorpos também são adequados para o tratamento da sepsia, de lesões pulmonares agudas mediadas por leucócitos, e de reacções alérgicas tais como a asma. Outras aplicações são a prevenção da rejeição de transplantes de órgãos e as doenças auto-imunes incluindo a artrite reumatóide. Para além disto, a metástase tumoral pode ser evitada inibindo a adesão de células cancerosas em circulação.

Na descrição também se descrevem os anticorpos acima para utilização num método para tratar um mamífero que sofra das patologias inflamatórias e trombóticas descritas acima, em particular de PAOD e de CLI (doença

oclusiva arterial periférica ou isquemia crítica de membros).

A invenção também proporciona a utilização dos anticorpos acima em terapia, por exemplo para o fabrico de medicamentos para o tratamento destas doenças.

A invenção também se relaciona com a utilização de anticorpos tal como se definiram acima para o fabrico de uma composição farmacêutica e inclui uma composição farmacêutica contendo um anticorpo descrito neste documento, numa quantidade eficaz do ponto de vista farmacêutico, opcionalmente em conjunto com um tampão e/ou com um adjuvante útil para a formulação dos anticorpos para finalidades farmacêuticas.

Também se descrevem neste documento composições farmacêuticas que incluam esses anticorpos num veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico. Numa concretização, a composição farmacêutica pode ser incluída num artigo, ou no fabrico de um estojo.

A descrição também proporciona linhas celulares de hibridoma, que produzem estes anticorpos monoclonais antagonísticos, por exemplo também se descrevem os anticorpos de origem neste documento.

A linha celular de hibridoma descrita neste documento, hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (anticorpo HuMab

002) foi depositada, nos termos do Tratado de Budapeste para o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismos para as finalidades dos procedimentos de patentes, junto da Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemanha:

<b>Linha celular</b>	<b>Depósito N°.</b>	<b>Data do Depósito</b>
hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002	DSM ACC264I	30/03/2004

Os anticorpos que se podem obter a partir destas linhas de células são concretizações preferidas da especificação.

Os anticorpos descritos neste documento são produzidos preferivelmente por métodos recombinantes. Estes métodos são conhecidos em geral na técnica e incluem a expressão proteica em células procarióticas e eucarióticas com isolamento subsequente do polipéptido do anticorpo e em geral uma purificação até a uma pureza aceitável do ponto de vista farmacêutico. Para a expressão proteica, inserem-se ácidos nucleicos codificando para as cadeias leve e pesada ou seus fragmentos nos vectores de expressão, pelos métodos habituais. Leva-se a cabo a expressão em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas apropriadas tais como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, leveduras, ou células de *E. coli*, e

recupera-se o anticorpo a partir das células (sobrenadante ou células após a lise).

A produção recombinante de anticorpos é bem conhecida no estado da técnica e está descrita, por exemplo, nos artigos de revisão de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* **17** (1999) 183-202; Geisse, S., *et al.*, *Protein Expr. Purif.* **8** (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* **16** (2000) 151-161; Wemer, R.G., *Drug Res.* **48** (1998) 870-880.

Os anticorpos podem estar presentes em células inteiras, num lisado celular, ou sob uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Leva-se a cabo a purificação para se eliminarem outras componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo outros ácidos nucleicos ou proteínas celulares, pelas técnicas habituais, incluindo tratamento alcalino/SDS, cromatografia em coluna e outras bem conhecidas na técnica. Veja-se Ausubel, F., *et al.*, editores *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing e Wiley Interscience, New York (1987).

A expressão em células NS0 foi descrita por, por exemplo, Barnes, L.M., *et al.*, *Cytotechnology* **32** (2000) 109-123; e por Barnes, L.M., *et al.*, *Biotech. Bioeng.* **73** (2001) 261-270. A expressão transiente está descrita em, por exemplo, Durocher, Y., *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* **30** (2002) E9. A clonagem de domínios variáveis está descrita por Orlandi, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**



(1989) 3833-3837; Carter, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89** (1992) 4285-4289; e Norderhaug, L., *et al.*, J. Immunol. Methods **204** (1997) 77-87. Um sistema de expressão transiente preferido (em HEK 293) foi descrito por Schlaeger, E.-J., e Christensen, K., em Cytotechnology **30** (1999) 71-83, e por Schlaeger, E.-J., em J. Immunol. Methods **194** (1996) 191-199.

As sequências de controlo que são adequadas para procarióticas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência de operador, e um local de ligação do ribossoma. Sabe-se que as células eucarióticas utilizam promotores, incrementadores e sinais de poliadenilação.

Um ácido nucleico está "operacionalmente ligado" quando está colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, o ADN para uma pré-sequência ou um líder de secreção está operacionalmente ligado ao ADN para um polipéptido quando é expresso sob a forma de uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou incrementador está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação quando afecta transcrição da sequência; ou um local de ligação de um ribossoma está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação quando está posicionado de modo a facilitar a tradução. Em geral, "operacionalmente ligado" significa que as sequências de ADN que se estão a ligar são contíguas, e, no caso de um líder de secreção, contíguas e

no quadro de leitura. No entanto, os incrementadores não têm que ser contíguos. Consegue-se a ligação por junção em locais convenientes de restrição. Caso não existam desses locais, utilizam-se os adaptadores ou agentes de ligação oligonucleotídicos sintéticos de acordo com a prática convencional.

Separam-se adequadamente os anticorpos monoclonais do meio de cultura por processos convencionais de purificação de imunoglobulinas tais como, por exemplo, sobre proteína A-Sepharose, cromatografia sobre hidroxapatite, electroforese sobre gel, diálise, ou cromatografia de afinidade. Isolam-se facilmente o ADN e o ARN codificando para os anticorpos monoclonais e sequenciam-se utilizando procedimentos convencionais. As células de hibridoma podem servir como fontes desses ADN e ARN. Uma vez isolado, o ADN pode ser inserido em vectores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras tais como células HEK 293, células CHO, ou células de mieloma que não produzam de outro modo proteínas imunoglobulina, para se obter a síntese dos anticorpos monoclonais recombinantes nas células hospedeiras.

Preparam-se variantes das sequências de aminoácidos (ou mutantes) de um anticorpo humano contra a P-selectina introduzindo alterações de nucleótidos apropriadas no ADN do anticorpo, ou por síntese oligonucleotídica. Tais modificações podem ser levadas a cabo, no entanto, apenas numa gama muito limitada, por

exemplo tal como se descreveu acima. Por exemplo, as modificações não alteram as características acima mencionadas do anticorpo tais como o seu isotipo IgG e a sua ligação a epítomos, mas podem melhorar o rendimento da produção recombinante, a estabilidade da proteína ou facilitar a sua purificação.

Também se pode substituir qualquer resíduo de cisteína não directamente envolvido na manutenção da conformação adequada do anticorpo anti-P-selectina, em geral por seria, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e evitar ligações cruzadas aberrantes. De forma inversa, podem adicionar-se ligações de cisteína ao anticorpo para melhorar a sua estabilidade (em especial quando o anticorpo for um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

Outro tipo de variante do anticorpo em aminoácidos altera o perfil original de glicosilação do anticorpo. Altera significa eliminar uma ou mais das espécies hidrato de carbono ligadas ao anticorpo, e/ou adicionando um ou mais locais de glicosilação que não estejam presentes no anticorpo. A glicosilação de anticorpos é tipicamente através de ligações a N. As ligações a N referem-se aos pontos de ligação da espécie hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X seja qualquer aminoácido excepto prolina, são as sequências de reconhecimento para a

ligação enzimática da espécie hidrato de carbono à cadeia lateral de asparagina. Deste modo, a presença de qualquer uma destas sequências tripeptídicas num polipéptido cria um local potencial para glicosilação. A adição de locais de glicosilação ao anticorpo é convenientemente conseguida alterando a sequência de aminoácidos de tal modo que contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas descritas acima (para locais de glicosilação ligados por N).

Preparam-se moléculas de ácido nucleico codificando para variantes de sequências de anticorpos anti-P-selectina por diversos métodos conhecidos no estado da técnica. Incluem-se neste métodos, sem que a estes eles se limitem, o isolamento a partir de fontes naturais (no caso de variantes de sequências de aminoácidos de ocorrência natural) ou a preparação por mutagénese mediada por oligonucleótidos (ou dirigida ao local), a mutagénese por PCR, e a mutagénese por cassete de uma variante preparada anteriormente ou de uma versão não variante de um anticorpo anti-P-selectina humanizado.

A descrição também diz respeito a imunoconjugados incluindo o anticorpo de acordo com a invenção conjugado com um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, uma toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente activa com uma origem bacteriana, fúngica, de plantas ou animais, ou seus fragmentos), um isótopo radioactivo (isto é, um radioconjugado) ou um precursor de um agente para a profilaxia ou para o tratamento de

patologias inflamatórias e trombóticas, em particular de PAOD e de CLI. Fabricam-se conjugados do anticorpo com o agente citotóxico recorrendo a uma série de agentes bifuncionais de acoplamento proteico, tais como o propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), o iminotiolano (IT), derivados funcionais de imidoésteres; (tais como o cloridrato de adipimato de dimetilo), ésteres activos (tais como o suberato de dissuccinimidilo), aldeídos (tais como o glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como a bis(p-azidobenzoíl)hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tais como a bis-(p-diazóniobenzoíl)-etilenodiamina), di-isocianatos (tais como o 2,6-di-isocianato de toluíleno), e compostos fluorados bis-activos (tais como o 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, pode preparar-se uma imunotoxina de rícino tal como se descreveu em Vitetta, E.S., *et al.*, Science **238** (1987) 1098-1104). Um exemplo de agente quelante para a conjugação de um radionucleótido com o anticorpo é o ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilenotriaminapenta-acético (MX-DTPA) marcado com carbono-14. Veja-se o WO 94/11.026.

Outro tipo de modificação covalente envolve acoplarem-se química ou enzimaticamente glicósidos com o anticorpo. Estes procedimentos são vantajosos por não necessitarem que se produza o anticorpo numa célula hospedeira que tenha capacidades de glicosilação para a glicosilação ligada por N ou por O. Consoante o modo de acoplamento utilizado, o ou os açúcares podem estar ligados (a) a arginina e histidina, (b) a grupos carboxilo livres,

(c) a grupos sulfidrilo tais como os da cisteína, (d) a grupos hidroxilo livres tais como os de serina, treonina, ou hidroxiprolina, (e) a resíduos aromáticos tais como os de fenilalanina, tirosina, ou triptofano, ou (f) ao grupo amida da glutamina. Estes métodos estão descritos no WO 87/05.330, e em Aplin, J.D., e Wriston, J.C. Jr., *CRC Crit. Rev. Biochem.* (1981) 259-306.

Pode conseguir-se a remoção de quais quer espécies hidrato de carbono presentes no anticorpo por via química ou enzimática. A desglicosilação química obriga a uma exposição do anticorpo ao composto ácido trifluorometanossulfónico, ou a um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maior parte ou de todos os açúcares, excepto o açúcar de ligação (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), deixando o anticorpo intacto. A desglicosilação química está descrita por Sojahn, H.T., e Bahl, O.P., *Arch. Biochem. Biophys.* **259** (1987) 52-57 e por Edge, A.S., *et al.* *Anal. Biochem.* **118** (1981) 131-137. A clivagem enzimática das espécies hidrato de carbono em anticorpos pode ser conseguida utilizando uma de uma série de endoglicosidases e exoglicosidases tal como descrito por Thotakura, N.R., e Bahl, O.P., *Meth. Enzymol.* **138** (1987) 350-359.

Outro tipo de modificação covalente do anticorpo inclui ligar-se o anticorpo a um de uma série de polímeros não proteicos, por exemplo poletilenoglicol, polipropilenoglicol, ou polioxialquilenos, da maneira

descrita nas Patentes US N<sup>os</sup>. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ou 4.179.337.

Noutro aspecto ainda, a descrição proporciona células B isoladas provenientes de um animal transgénico não humano, por exemplo um murganho transgénico, que expresse anticorpos anti-P-selectina humanos (por exemplo os murganhos expressando anticorpos de origem produzidos pela linha de células hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641) descritos neste documento são murganhos transcromossomais adequados. O murganho KM contém um transcromossoma da cadeia pesada humana e um transgene da cadeia humana leve *kappa*. Os genes endógenos da cadeia pesada e leve do murganho também foram comprometidos nos murganhos KM de tal modo que uma imunização dos murganhos leva à produção das imunoglobulinas humanas e não à das imunoglobulinas do murganho. A construção de murganhos KM e a sua utilização para criar imunoglobulinas humanas está descrita em pormenor no WO 02/43.478.

Preferivelmente, as células B isoladas são obtidas de um animal transgénico não humano, por exemplo de um murganho transgénico, que tenha sido imunizado com uma forma purificada ou recombinante de antigénio de P-selectina e /ou células expressando a P-selectina. Preferivelmente, o animal transgénico não humano, por exemplo um murganho transgénico, tem um genoma que inclua um transgene de uma cadeia pesada humana e um transgene de uma cadeia leve humana codificando a totalidade ou uma

parte de um anticorpo descrito neste documento. As células B isoladas são então imortalizadas para proporcionarem uma fonte (por exemplo um hibridoma) de anticorpos anti-P-selectina humanos. Deste modo, a descrição também descreve um hibridoma capaz de produzir anticorpos monoclonais humanos de acordo com a invenção. Numa concretização, o hibridoma inclui uma célula B obtida de um animal transgénico não humano, por exemplo, um murganho transgénico possuindo um genoma que inclua um transgene de uma cadeia pesada humana e um transgene de uma cadeia humana codificando para a totalidade ou para uma parte de um anticorpo da invenção, fundidos a uma célula imortalizada.

Numa concretização específica, o animal transgénico não humano é um murganho transgénico que tenha um genoma que inclua um transgene de uma cadeia pesada humana e um transgene de uma cadeia humana codificando para a totalidade ou para uma parte de um anticorpo da invenção. Pode imunizar-se o animal transgénico não humano com uma preparação purificada ou enriquecida de antigénio de P-selectina e/ou com células que expressem P-selectina. Preferivelmente, o animal transgénico não humano, por exemplo o murganho transgénico, é capaz de produzir isotipos de P-selectina de anticorpos monoclonais humanos para a P-selectina.

Os anticorpos monoclonais humanos descritos neste documento podem ser produzidos imunizando um animal



transgénico não humano, por exemplo um murganho transgénico, tendo um genoma que inclua um transgene de uma cadeia pesada humana e um transgene de uma cadeia leve humana codificando para a totalidade ou para uma parte de um anticorpo da invenção, com uma preparação purificada ou enriquecida de antigénio de P-selectina e/ou células que expressem P-selectina. Obtêm-se então células B (por exemplo células B do baço) do animal, e fundem-se com células de mieloma para formar células hibridoma imortais, que segregam anticorpos monoclonais humanos contra a P-selectina.

Numa concretização preferida, podem gerar-se anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra a P-selectina utilizando murganhos transgénicos portadores de parte do sistema imunológico humano em vez do sistema do murganho. Estes murganhos transgénicos, referidos neste documento como murganhos "HuMabs", contêm minilocais de um gene de imunoglobulina humana que codifica para genes de imunoglobulina humana não transpostos que incluem a cadeia pesada ( $\mu$  e  $\gamma$ ) e a cadeia leve  $\kappa$  (genes da região constante), em conjunto com mutações alvejadas que inactivam os locais das cadeias endógenas  $\mu$  e  $\kappa$  (Lonberg, N., *et al.*, Nature **368** (1994) 856-859). Deste modo, os murganhos exibem uma menor expressão de IgM ou K de murganho, e em reacção à imunização, os transgenes de cadeias leve e pesada humanas introduzidos sofrem uma permuta de classe e uma mutação somática para gerar anticorpos monoclonais IgG humanos de alta afinidade

(Lonberg, N., *et al.*, *Nature* **368** (1994) 856-859; revisto em Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* **113** (1994) 49-101; Lonberg, N., e Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* **25** (1995) 65-93; e Harding, F., e Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci* **764** (1995) 536-546). A preparação de murganhos HuMab foi descrita em Taylor, L., *et al.*, *Nucleic Acids Research* **20** (1992) 6287-6295; Chen, J., *et al.*, *International Immunology* **5** (1993) 647-656; Tuailleon, N., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **90** (1993) 3720-3724; Choi, T.K., *et al.*, *Nature Genetics* **4** (1993) 117-123; Chen, J., *et al.*, *EMBO J.* **12** (1993) 821-830; Tuailleon, N., *et al.*, *Immunol.* **152** (1994) 2912-2920; Lonberg, N., *et al.*, *Nature* **368** (1994) 856-859; Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* **113** (1994) 49-101; Taylor, L., *et al.*, *Int. Immunol.* **6** (1994) 579-591; Lonberg, N., e Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* **25** (1995) 65-93; Harding, F., e Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci* **764** (1995) 536-546; Fishwild, D.M., *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **14** (1996) 845-851, cujos conteúdos são deste modo incorporados integralmente por citação. Vejam-se além disto as Patentes US N<sup>os</sup>. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.545.807; 5.770.429;, e os WO 98/24.884; WO 94/25.585; WO 93/1.227; WO 92/22.645; e WO 92/03.918.

Para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos contra a P-selectina, podem imunizar-se murganhos HuMab com uma preparação purificada ou enriquecida de antigénio de P-selectina e/ou com células que expressem a

P-selectina, de acordo com o método geral, tal como descrito por Lonberg, N., *et al.*, Nature **368** (1994) 856-859; Fishwild, D.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. **14** (1996) 845-851 e no WO 98/24.884. Preferivelmente, os murganhos terão 6-16 semanas de idade na altura da primeira imunização. Por exemplo, pode utilizar-se uma preparação purificada ou enriquecida de antigénio solúvel da P-selectina (por exemplo purificado de células que expressem P-selectina), para imunizar os murganhos HuMab por via intraperitoneal. No caso em que as imunizações recorrendo a uma preparação purificada ou enriquecida de antigénio da P-selectina não originem anticorpos, também se podem imunizar os murganhos com células que expressem P-selectina, por exemplo, uma linha de células de tumor, para promover reacções imunológicas. Uma experiência acumulada com diversos antigénios demonstrou que os murganhos transgénicos HuMab reagem optimamente quando são inicialmente imunizados por via intraperitoneal (i.p.) com antigénio em adjuvante de Freund completo, seguindo-se semana sim, semana não, uma imunização i.p. (por exemplo, até um total de 6) com antigénio em adjuvante de Freund incompleto. A reacção imunológica pode ser monitorizada ao longo do decurso do protocolo de imunização, obtendo-se amostras de plasma por sangrias retro-orbitais. Pode despistar-se o plasma por ELISA, e podem utilizar-se murganhos com títulos suficientes e imunoglobulina humana anti-P-selectina para a imortalização das células B correspondentes. Podem fazer-se reforços de antigénio por via endovenosa nos murganhos 3 a 4 dias antes do sacrifício

e remoção do baço e dos nodos linfáticos. Espera-se terem que ser feitas 2-3 fusões para cada antigénio. Serão imunizados diversos murganhos para cada antigénio. Por exemplo, pode imunizar-se um total de doze murganhos HuMabs das estirpes HCo7 e HCo12.

Os murganhos HCo7 apresentam uma ruptura JKD nos genes da sua cadeia leve endógena (*kappa*) (tal como descrito em Chen, J., et al., EMBO J. **12** (1993) 821-830), uma ruptura CMD nos genes da sua cadeia pesada endógena (tal como descrito no Exemplo 1 do WO 01/14.424), um transgene KCo5 humano *kappa* de cadeia leve (tal como descrito em Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. **14** (1996) 845-851), e um transgene HCo7 humano da cadeia pesada (tal como descrito na Patente US N<sup>o</sup>. 5.770.429).

Os murganhos HCo12 têm uma ruptura JKD nos genes da sua cadeia leve endógena (*kappa*) (tal como descrito em Chen, J., et al., EMBO J. **12** (1993) 821-830), uma ruptura CMD nos genes endógenos da sua cadeia pesada (tal como descrito no Exemplo 1 do WO 01/14.424), um transgene humano KCo5 da cadeia leve *kappa* (tal como descrito em Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. **14** (1996) 845-851), e um transgene HCo12 da cadeia pesada humana (tal como descrito no Exemplo 2 do WO 01/14.424). Os linfócitos do murganho podem ser isolados e fundidos com uma linha de células de mieloma de murganho utilizando PEG com base nos protocolos padrão para gerar hibridomas. Os hibridomas resultantes são então despistados para a produção de anticorpos específicos

para antigénios. Por exemplo, fundem-se suspensões de células únicas de linfócitos do baço e derivados de nodos linfáticos a partir de murganhos imunizados, com um sexto da quantidade numérica de células de mieloma de murganho SP 2/0 não segregantes (ATCC, CRL 1581) com 50 % de PEG. Plaqueiam-se as células a cerca de  $2 \times 10^5$  numa placa de microtitulação de fundo chato, seguindo-se cerca de duas semanas de incubação num meio selectivo.

Despistam-se então em células individuais por ELISA, os anticorpos monoclonais humanos IgM e IgG anti-P-selectina. Uma vez tendo ocorrido crescimento extensivo de hibridomas, analisa-se o meio, em geral passados 10-14 dias. Substituem-se os hibridomas que segregam anticorpo, despistam-se de novo, e caso ainda estejam positivos para anticorpos monoclonais anti-P-selectina IgG humanos, podem ser subclonados pelo menos duas vezes por diluição limitativa. Os subclones estáveis são então cultivados *in vitro* para se produzirem anticorpos em meio de cultura de tecidos, para caracterização.

Uma vez que as sequências CDR são responsáveis pelas interacções anticorpo-antigénio, é possível expressar os anticorpos recombinantes descritos neste documento construindo vectores de expressão que incluam as sequências CDR de acordo cm a invenção em sequências do quadro provenientes de um a anticorpo humano diferente (veja-se, por exemplo, Riechmann, L., *et al.*, Nature **332** (1998) 323-327; Jones, P., *et al.*, Nature **321** (1986) 522-525; e Queen,

C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86** (1989) 10029-10033). Podem obter-se estas sequências do quadro a partir de bases de dados de ADN que são públicas e incluem as sequências genéticas da linha de gérmen de anticorpos humanos. estas sequências da linha de gérmen diferem das sequências genéticas dos anticorpos maduros porque não incluem genes variáveis completamente montados, que são obtidos por junção V(D)J durante a maturação de células B. As sequências de linha de gérmen também diferirão das sequências dos anticorpos do repertório secundário de alta afinidade em posições individuais ao longo da região variável.

A descrição inclui também a utilização de um anticorpo descrito neste documento para o diagnóstico de P-selectina *in vitro*, preferivelmente por um ensaio imunológico para determinar a ligação entre a P-selectina de uma amostra e o anticorpo descrito neste documento.

Noutro aspecto, descreve-se neste documento uma composição, por exemplo uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais humanos, ou a sua porção que se liga ao antigénio, descrita: neste documento, formulada em conjunto com um veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico. Mais especificamente, a composição é uma composição farmacêutica ou uma composição de diagnóstico e ainda mais especificamente a composição farmacêutica inclui um

anticorpo tal como se descreveu acima e pelo menos um excipiente aceitável do ponto de vista farmacêutico.

As composições farmacêuticas descritas neste documento também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma composição da invenção presente com pelo menos um agente útil na profilaxia ou no tratamento de uma doença associada com isquémica crítica de membros (CLI/PAOD) ou com outra terapia convencional.

Tal como se utiliza neste documento, "veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico" inclui todo e qualquer solvente, meio de dispersão, revestimento, agente antibacteriano e antifúngico, agente de isotonicidade e de atraso da absorção, e outros semelhantes, que sejam compatíveis do ponto de vista fisiológico. Preferivelmente, o veículo é adequado para administração por via endovenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinal ou epidérmica (por exemplo por injeção ou por infusão).

Um "sal aceitável do ponto de vista farmacêutico" refere-se a um sal que mantenha a actividade biológica pretendido anticorpo e que não confira quaisquer efeitos toxicológicos indesejáveis (veja-se por exemplo Berge, S.M., *et al.*, J. Pharm. Sci. **66** (1977) 1-19). Estes sais são descritos neste documento. Incluem-se nos exemplos de sais destes os sais de adição a ácidos e os sais de adição

a bases. Incluem-se nos sais de adição a ácidos os derivados de sais inorgânicos não tóxicos, tais como os sais clorídricos.

Pode administrar-se uma composição descrita neste documento por uma série de métodos conhecidos na técnica. Tal como seria apreciado pelo especialista na técnica, a via e/ou o modo de administração variarão consoante os resultados pretendidos.

Para se administrar um composto descrito neste documento por determinadas vias de administração, pode ser necessário revestir o composto com, ou co-administrar o composto, um material para evitar a sua inactivação. Por exemplo, pode administrar-se o composto a um sujeito num veículo apropriado, por exemplo, lipossomas, ou num diluente. Incluem-se nos diluentes aceitáveis do ponto de vista farmacêutico o soro salino e as soluções de tampões aquosos.

Incluem-se nos excipientes ou veículos aceitáveis do ponto de vista farmacêutico as soluções ou dispersões aquosas estéreis e os pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou de dispersões estéreis injectáveis. A utilização destes meios e agentes para substâncias activas do ponto de vista farmacêutico integra o estado da técnica.



As frases "administração parenteral" e "administrado por via parenteral", tal como se utilizam neste documento, significam modos de administração para além da administração entérica e tópica, em geral por injeção, e incluem, sem limitação, a injeção ou infusão endovenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea; subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnóide, intraespinal, epidural e intraesternal.

Estas composições também podem conter excipientes ou adjuvantes tais como conservantes, agentes molhantes, agentes emulsionantes e agentes dispersantes. Pode assegurar-se o impedimento da presença de micro-organismos tanto por processos de esterilização, acima, como pela inclusão de diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, e outros semelhantes. Também pode ser desejável incluir agentes de isotonicidade, tais como açúcares, cloreto de sódio, e outros semelhantes, nas composições. Além disto, a absorção prolongada do produto farmacêutico sob forma injectável pode ser conseguida através da inclusão de agentes que atrasem a absorção, tais como o monoestearato de alumínio e a gelatina.

Independentemente da via de administração seleccionada, formulam-se os compostos da invenção presente, que se podem utilizar sob uma forma adequadamente

hidratada, e/ou as composições farmacêuticas descritas neste documento, em formas de dosagem aceitáveis, por métodos convencionais conhecidos por parte dos técnicos da especialidade.

Podem variar-se os teores de dosagem utilizados para os ingredientes activos nas composições farmacêuticas descritas neste documento, de modo a obter-se o teor em ingrediente activo que seja eficaz para se conseguir a reacção terapêutica pretendida especificamente para cada paciente, composição, e modo de administração, sem exibir toxicidade para o paciente. O teor de dosagem seleccionado dependerá de uma série de factores farmacocinéticos, incluindo a actividade das composições específicas da invenção presente que se empregarem, ou dos seus ésteres, sais ou amidas, a via de administração, a altura da administração, a taxa de excreção do composto que especificamente for utilizado, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais que se utilizem em combinação com as composições especificamente utilizadas, da idade, sexo, peso, do estado, da saúde em geral e do historial médico anterior do paciente que se esteja a tratar, bem como de factores semelhantes bem conhecidos na especialidade medicinal. Uma dosagem semanal típica poderá ser de entre cerca de 0,1 mg/kg e cerca de 20 mg/kg ou mais, consoante os factores listados acima.

A composição tem que ser estéril e fluida na medida em que a composição possa ser administrada por

intermédio de uma seringa. Para além de água, o veículo pode ser uma solução salina isotónica tamponizada, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, bem como outros semelhantes), e misturas adequadas de quaisquer destes.

Pode manter-se a fluidez adequada, por exemplo, recorrendo a um revestimento tal como lecitina, mantendo a dimensão necessária das partículas caso se utilize uma dispersão, e através da utilização de tensioactivos. Em muitos casos, é preferível incluir na composição agentes de isotonicidade, por exemplo açúcares, poliálcoois tais como manitol ou sorbitol, e cloreto de sódio. Pode conseguir-se uma absorção a longo prazo das composições injectáveis incluindo na composição um agente que atrase a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio ou gelatina.

A descrição inclui um método para o tratamento de um paciente que necessite de terapia, caracterizado por se administrar ao paciente uma quantidade eficaz do ponto de vista terapêutico de um anticorpo que se ligue à P-selectina, contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana e não se ligue ao factor complemento Clq.

A descrição inclui a utilização de um anticorpo que se ligue à P-selectina, contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana e não se ligue ao factor complemento Clq em terapia.

A descrição inclui a utilização de um anticorpo que se ligue à P-selectina, contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana e não se ligue ao factor complemento Clq para a preparação de um medicamento para a profilaxia e o tratamento de patologias inflamatórias e trombóticas.

A descrição inclui a utilização de um anticorpo que se ligue à P-selectina, contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana e não se ligue ao factor complemento Clq para o tratamento de PAOD e de CLI.

A descrição proporciona portanto um anticorpo que se ligue à P-selectina, não se ligue ao factor complemento Clq, e contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana, e que seja caracterizado por o referido anticorpo ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana no qual o S228 está substituído por P e o L235 está substituído por E. Numa concretização descrita neste documento, o anticorpo é um anticorpo humano. Noutra concretização descrita neste documento, o anticorpo é um anticorpo humanizado.

Numa concretização neste documento descreve-se um anticorpo que se ligue à P-selectina, não se ligue ao factor complemento Clq, e contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana, que é caracterizado por o anticorpo referido ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana em que o S228 esteja substituído por P e o L235 esteja substituído por E, em que a não ligação do anticorpo ao factor complemento Clq se refere a uma medição através de um

ensaio ELISA no qual a ligação máxima ( $B_{max}$ ) do Clq ao anticorpo a uma concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  do anticorpo seja  $\leq 30 \%$  do  $B_{max}$  do anticorpo LC 1004-002 da linha de células hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641). Noutra concretização, a ligação máxima seja  $\leq 20 \%$  do  $B_{max}$  do anticorpo LC 1004-002 da linha de células hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641).

Numa concretização descrita neste documento, caracteriza-se um anticorpo que se ligue à P-selectina, não se ligue ao factor complemento Clq, e contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana, por o referido anticorpo ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana no qual o S228 esteja substituído por P e o L235 esteja substituído por E, em que o anticorpo se ligue à P-selectina com um valor de  $K_D$  inferior a  $10^{-8}$  M num ensaio BIAcore. Noutra concretização a gama de valores de  $K_D$  é de entre  $10^{-11}$  e  $10^{-9}$  M.

Numa concretização descreve-se neste documento um anticorpo que se ligue à P-selectina, não se ligue ao factor complemento Clq, e contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana, que se caracteriza por o referido anticorpo ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana no qual o S228 esteja substituído por P e o L235 esteja substituído por E, em que o anticorpo se ligue pelo menos 1.000 vezes mais especificamente à P-selectina do que a E-selectina e/ou a L-selectina, tal como medido pelos valores de  $EC_{50}$  num ensaio ELISA, em que se revista uma placa de microtitulação com P-selectina e com E-selectina e/ou L-

selectina. Noutra concretização, os valores de  $EC_{50}$  em relação a transfectantes de E-selectina e L-selectina são superiores a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Numa concretização, descreve-se neste documento um anticorpo que se ligue à P-selectina, não se ligue ao factor complemento Clq, e contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana, que se caracteriza por o referido anticorpo ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana no qual o S228 esteja substituído por P e o L235 esteja substituído por E, em que o anticorpo iniba a adesão de células HL60 semelhantes a leucócitos a P-selectina purificada com um valor de  $IC_{50}$  não superior a 1  $\mu\text{g/mL}$ . Noutra concretização, o valor de  $IC_{50}$  será de entre 0,08 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Noutra concretização ainda, o valor de  $IC_{50}$  será de entre 0,08 e 0,11  $\mu\text{g/mL}$ .

Numa concretização descreve-se neste documento um anticorpo que se ligue à P-selectina, não se ligue ao factor complemento Clq, e contenha uma parte Fc derivada de uma origem humana, que se caracteriza por o referido anticorpo ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana no qual o S228 esteja substituído por P e o L235 esteja substituído por E, no qual

(a) inibe a adesão de células HL60 semelhantes a leucócitos a plaquetas activadas com um valor de  $IC_{50}$  de entre 0,05 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$ ;

(b) o anticorpo inibe a interacção de leucócitos com uma monocamada de plaquetas em mais do que 70 %;

(c) o anticorpo inibe a adesão de leucócitos a células endoteliais activadas num sistema de fluxo humano, na gama de entre 60 e 90 %, quando a uma concentração de 3 µg/mL;

(d) o anticorpo não se liga à proteína C3;

(e) o anticorpo não origina citotoxicidade dependente do complemento (CDC);

(f) o anticorpo não se liga a receptores Fcγ em células efectivadoras NK; ou

(g) o anticorpo não origina citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC).

Numa concretização descreve-se neste documento um anticorpo que se liga a P-selectina e é caracterizado por a sequência de aminoácidos da cadeia pesada CDR3 do referido anticorpo ser a sequência CDR3 da cadeia pesada da SEQ ID NO: 39.

Numa concretização descreve-se neste documento um anticorpo que se liga a P-selectina, inclui uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável, é caracterizado

por a cadeia pesada variável incluir as sequências CDR que são CDR1, CDR2 e CDR3 e a CDR1 é a SEQ ID NO: 30, a CDR2 é a SEQ ID NO: 34, a CDR3 é a SEQ ID NO: 39, em que as referidas CDR são seleccionadas independentemente umas das outras.

Numa concretização descreve-se neste documento um anticorpo que é caracterizado por a cadeia leve variável incluir as sequências CDR que são CDR1, CDR2 e CDR3, e CDR1 é a SEQ ID NO: 43, CDR2 é a SEQ ID NO: 45 e CDR3 é a SEQ ID NO: 48, em que as referidas CDR são seleccionadas independentemente umas das outras.

Numa concretização descreve-se neste documento um anticorpo que se caracteriza por o referido anticorpo se ligar à P-selectina e por o anticorpo incluir uma região variável seleccionada de entre o domínio da cadeia leve variável definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO:3 e o domínio variável da cadeia pesada definido pela SEQ ID NO:4.

Numa concretização descreve-se neste documento um anticorpo que se liga à P-selectina, não se liga ao factor complemento C1q, contém uma parte Fc derivada de uma origem humana, é caracterizado por o anticorpo referido ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana em que o S228 seja substituído por P e o L235 seja substituído por E, em que o anticorpo inclua as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 do domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de



aminoácidos SEQ ID NO:3 e as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 do domínio variável da cadeia pesada definido por SEQ ID NO:4. Noutra concretização o anticorpo inclui o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO:3 e o domínio variável da cadeia pesada definido pela SEQ ID NO:4.

Numa concretização descreve-se neste documento um anticorpo que se liga à P-selectina, não se liga ao factor complemento C1q, contém uma parte Fc derivada de uma origem humana, e se caracteriza por o anticorpo referido ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana em que o S228 esteja substituído por P e o L235 esteja substituído por E, em que

(a) o anticorpo inclui pelo menos uma mutação de um aminoácido na parte Fc, provocando a não ligação ao factor complemento C1q;

(b) a região constante da cadeia pesada humana inclua a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 28;

(c) o anticorpo inclua uma região da cadeia leve  $\kappa$  tal como definida na SEQ ID NO:23;

(d) o anticorpo inclua pelo menos uma mutação de um aminoácido provocando a não ligação ao complemento C1q;

(e) o anticorpo inclua a região constante da cadeia pesada IgG4v1; ou

(f) o anticorpo seja um fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub> ou de cadeia singela.

Numa concretização a invenção proporciona um anticorpo anti-P-selectina, caracterizado por ser um anticorpo humano ou humanizado.

Noutras concretizações, o anticorpo descrito neste documento inclui a sequência de aminoácidos tal como definida pela SEQ ID NO: 28 para a região constante da cadeia pesada  $\gamma$ 4. Noutra concretização ainda, o anticorpo de origem descrito neste documento é produzido pela linha de células hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC264).

Deve entender-se que a descrição proporciona as concretizações com as definições tal como descritas nos treze parágrafos anteriores, e também as suas combinações.

Os exemplos, referências, a listagem de sequências e as figuras, que se seguem, são proporcionados para ajudar na compreensão da invenção.

#### **Descrição da listagem de sequências**

SEQ ID NO:1 LC1004-001 Cadeia leve, domínio variável de HuMab 1004-001

SEQ ID NO:2 LC1004-001 Cadeira pesada, domínio variável de HuMab 1004-001

SEQ ID NO:3 LC 1004-002 Cadeira leve, domínio variável de HuMab 002

SEQ ID NO:4 LC 1004-002 Cadeira pesada, domínio variável de HuMab 002

SEQ ID NO:5 LC 1004-003 Cadeira leve, domínio variável de HuMab 003

SEQ ID NO:6 LC 1004-003 Cadeira pesada, domínio variável de HuMab 003

SEQ ID NO:7 LC 1004-004 Cadeira leve (I), domínio variável de HuMab 004 (I)

SEQ ID NO:8 LC 1004-004 Cadeira pesada (I), domínio variável de HuMab 004 (I)

SEQ ID NO:9 LC 1004-004 Cadeira leve (II), domínio variável de HuMab 004 (II)

SEQ ID NO:10 LC 1004-004 Cadeira pesada (II), domínio variável de HuMab 004 (II)

SEQ ID NO:11 Cadeira leve, domínio variável de HuMab 005

SEQ ID NO:12 Cadeira pesada, domínio variável de HuMab 005

SEQ ID NO:13 Cadeira leve, domínio variável de HuMab 010 (I)

SEQ ID NO:14 Cadeira pesada, domínio variável de HuMab 010 (I)

SEQ ID NO:15 Cadeira leve, domínio variável de HuMab 010 (II)

SEQ ID NO:16 Cadeia pesada, domínio variável de  
HuMab 010 (II)

SEQ ID NO:17 Cadeia leve, domínio variável de  
HuMab 010 (III)

SEQ ID NO:18 Cadeia pesada, domínio variável de  
HuMab 010 (III)

SEQ ID NO:19 Cadeia leve, domínio variável de  
HuMab 011

SEQ ID NO:20 Cadeia pesada, domínio variável de  
HuMab 011

SEQ ID NO:21 Cadeia leve, domínio variável de  
HuMab 017

SEQ ID NO:22 Cadeia pesada, domínio variável de  
HuMab 017

SEQ ID NO:23  $\kappa$  Cadeia leve região constante

SEQ ID NO:24  $\gamma$ 1 Cadeia pesada região constante

SEQ ID NO:25  $\gamma$ 1 Cadeia pesada região constante  
PVA236/GLPSS331 (IgG1v1)

SEQ ID NO:26  $\gamma$ 1 Cadeia pesada região constante  
L234A/L235A (IgG1v2)

SEQ ID NO:27  $\gamma$ 4 Cadeia pesada região constante

SEQ ID NO:28  $\gamma$ 4 Cadeia pesada região constante  
S228/L235E (IgG4v1)

SEQ ID NO:29-32 Cadeia pesada CDR1

SEQ ID NO:33-37 Cadeia pesada CDR2

SEQ ID NO:38-42 Cadeia pesada CDR3

SEQ ID NO:43-44 Cadeia leve CDR1

SEQ ID NO:45-46 Cadeia leve CDR2

SEQ ID NO:47-52 Cadeia leve CDR3

### **Abreviaturas:**

Abreviam-se os aminoácidos quer pelo seu código de três letras (Leu) ou pelo de uma letra (L)

O anticorpo HuMab 00X também é denominado anticorpo 00X

L234 significa o aminoácido leucina na posição 234 de acordo com a numeração EU (Kabat)

L234A significa que o aminoácido leucina na posição 234 foi alterado para alanina

PVA236 significa que na região 236 o ELLG de IgG1 ou o EFLG de IgG4 está alterado no PVA

GLPSS331 significa que na região 331 o ALPAP de IgG1 ou o GLPAP de IgG2 foi alterado a GLPSS

As alterações nas outras subclasses de IgG analogamente

### **EXEMPLOS**

#### **Geração de uma linha de células hibridoma produzindo anticorpos anti-P-selectina**

##### **Cultura de hibridomas**

Cultivaram-se hibridomas HuMab em IMDM (Cambrex), clone 1 de soro Fetal Bovino (Perbio Science), factor de clonagem de origem de Hibridoma (Igen), piruvato de sódio,

penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol, HAT (Sigma-Aldrich) e Canamicina (Invitrogen) a 37°C sob 5 % de CO<sub>2</sub>.

**Geração de uma linha de células hibridoma produzindo anticorpos anti-P-selectina: Processo de imunização de murganhos transgênicos**

**Protocolo A:**

Imunizaram-se 10 murganhos transgênicos HCo7 (5 do sexo masculino e 5 do sexo feminino), da estirpe GG2201 (Medarex, San José, CA, EUA) com uma forma truncada recombinante da P-selectina que não tem a transmembrana nem o domínio citoplásmico da P-selectina e que foi adquirida junto da R&D Systems. Para a primeira imunização, misturaram-se 50 µg de P-selectina recombinante dissolvida em 100 µL de PBS, com 100 µL de adjuvante de Freund completo. Nas restantes imunizações utilizou-se P-selectina recombinante acoplada com KLH. Para a segunda imunização dissolveram-se 50 µg de P-selectina recombinante acoplada com KLH em 100 µL de PBS e misturou-se com 100 µL de adjuvante de Freund incompleto. Para as restantes imunizações dissolveram-se 20 µg de P-selectina recombinante acoplada com KLH em 100 µL de PBS e misturou-se com 100 µL de adjuvante de Freund incompleto. Administraram-se as imunizações alternadamente pelas vias interperitoneal e subcutânea, começando com uma imunização interperitoneal.

### **Protocolo B:**

Imunizaram-se 3 murganhos transgênicos HCo7 (todos do sexo feminino) e 3 murganhos transgênicos KM (todos do sexo masculino), da estirpe GG2489 (Medarex, San José, CA, EUA) com P-selectina de comprimento inteiro purificada a partir de plaquetas humanas fora do prazo por cromatografia de imunoafinidade (veja-se adiante). Para a primeira imunização, misturaram-se 50 µg da P-selectina purificada, dissolvidos em 100 µL de PBS, com 100 µL de adjuvante de Freund completo (CFA; Difco Laboratories, Detroit, EUA). Para a segunda imunização misturaram-se 50 µg da P-selectina purificada dissolvidos em 100 µL de PBS, com 100 µL de adjuvante incompleto de Freund (ICFA; Difco).

Para todas as outras imunizações, utilizaram-se 20 µg da P-selectina purificada e misturaram-se com 100 µL de adjuvante de Freund incompleto.

### **ELISA específico para antígenios**

Determinaram-se os títulos anti-P-selectina de soros de murganhos imunizados recorrendo a ELISA específico para antígenios. Revestiu-se a placa (placa com 96 poços de fundo plano para ELISA, Greiner) com 0,1 µg/mL de P-selectina purificada dissolvida em PBS, deixando-se revestir de um dia para o outro à temperatura ambiente. Em seguida, bloquearam-se os poços com PBSTC (PBS contendo

0,05 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie BV) e 2 % de soro de frango (Gibco)) durante 1 hora à temperatura ambiente.

Diluíram-se a 1:100 em PBSTC amostras de soro testado, e adicionaram-se aos poços. Dissolveu-se soro obtido dos murganhos antes da imunização a 1:100 em PBSTC e utilizou-se como controlo negativo. Dissolveu-se um anticorpo de murganho dirigido contra P-selectina humana (1/7, produzido na empresa por Roche Basileia) a 1:100 em PBSTC e utilizou-se como controlo positivo. Incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente. Subsequentemente lavaram-se as placas por duas vezes com PBST (PBS contendo 0,05 % de Tween 20. Diluiu-se Gt- $\alpha$ -huIgG-HRP (Jackson) a 1:5.000 em PBSTC e adicionou-se aos poços que continham as amostras testadas e aos do controlo negativo. Diluiu-se Rb- $\alpha$ -mIgG (Jackson) a 1:3.000 com PBSTC e adicionou-se aos poços que continham o controlo positivo. Incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente. Por último, lavaram-se as placas duas vezes com PBST e revelaram-se com solução de ABTS<sup>®</sup> preparada de fresco (a 1 mg/mL) (ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) durante 30 minutos à temperatura ambiente (TA) às escuras. Mediu-se a absorvância a 405 nm.

### **Reforço dos murganhos**

Quando os títulos em anti-P-selectina no sangue eram suficientes, reforçaram-se ainda mais duas vezes com



20 µg de P-selectina recombinante humana em 100 µL de PBS, por via endovenosa, 4 e 3 dias antes da fusão.

### **Geração de hibridoma**

Sacrificaram-se os murganhos e obtiveram-se os seus baços e os nodos linfáticos flanqueando a aorta abdominal e a veia cava. Levou-se a cabo a fusão das células dos baços e dos nodos linfáticos com o parceiro de fusão, células SP 2.0, seguindo os procedimentos operatórios padrão.

Obtiveram-se anticorpos monoclonais humanos com sequências variáveis pesadas e leves das SEQ ID N<sup>OS</sup>. 1-22 pelo procedimento de imunização.

### **κ-ELISA.**

Para se determinar se os hibridomas que resultaram da fusão geravam anticorpos humanos, levou-se a cabo um κ-ELISA. Revestiram-se placas de ELISA com anticorpo IgG κ-cadeia leve de rato anti-humano (DAKO) diluído a 1/10.000 em PBS, por incubação de um dia para o outro a 4°C. Depois de descartar os poços, bloquearam-se as placas por incubação com PBSTC durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, incubaram-se os poços com sobrenadante de cultura de hibridoma, diluído a 1/2 em PBSTC. Utilizou-se meio de cultura diluído a 1/2 com PBSTC como controlo negativo, e utilizou-se soro de murganho κ-

leve positivo diluído a 1/100 com PBSTC como controle positivo. Subsequentemente lavaram-se os poços por três vezes e incubaram-se com F(ab')<sub>2</sub> de IgG de rato anti-humano conjugado com HRP (DAKO), diluído a 1/2.000 com PBSTC durante 1 h a 37°C. Lavaram-se os poços por três vezes e revelaram-se os ensaios com solução de ABTS® preparada de fresco (a 1 mg/mL) durante 30 minutos à temperatura ambiente (TA) às escuras. Mediu-se a absorvância a 405 nm num leitor de placas de ELISA.

**Clonagem e análise das sequências dos domínios variáveis de anti-P-selectina Humana (cadeias  $\kappa$ -leve e  $\gamma$ 1-pesada)**

As sequências nucleotídicas codificando para a região da cadeia leve V<sub>L</sub> e para a região da cadeia pesada V<sub>H</sub> dos HuMabs contra P-selectina foram isoladas por um procedimento padrão de síntese de cADN / PCR.

Preparou-se o ARN total a partir de 1x10<sup>6</sup> - 1x10<sup>7</sup> células hibridoma, utilizando o Mini Estorjo RNeasy® (Qiagen). Utilizou-se RNA derivado de hibridomas como perfil para a síntese da 1<sup>a</sup> cadeia do cADN, a qual se levou a cabo de acordo com um método convencional recorrendo a um iniciador oligo dT. Levaram-se a cabo a síntese da 2<sup>a</sup> cadeia do cADN e a amplificação adicional por PCR dos fragmentos de cADN codificando para as V<sub>L</sub> e V<sub>H</sub>, recorrendo respectivamente a iniciadores reversos de cadeia leve e de cadeia pesada, complementares das sequências nucleotídicas

da região constante das cadeias  $\kappa$ -leve e  $\gamma 1$ -pesada, e a iniciadores específicos a 5' para as cadeias leve e pesada. Clonaram-se os produtos de PCR utilizando o estojo de clonagem TOPO TA das tecnologias vitais da Invitrogen™, e o pCR4-TOPO a título de vector de clonagem. Identificaram-se os produtos de PCR clonados por mapeamento por restrição dos plasmídeos apropriados utilizando *EcoRI* para a digestão e dimensões de fragmentos expectáveis / calculadas de ADN de, respectivamente, cerca de 740 e 790 pb para  $V_L$  e para  $V_H$ .

Determinou-se a sequência de ADN dos fragmentos clonados por PCR por sequenciação de dupla cadeia.

Utilizou-se o conjunto de programas da GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), versão 10.2, para o processamento dos dados em geral. Alinharam-se as sequências de ADN e proteicas, utilizando o módulo CLUSTALW deste GCG. Tabularam-se os alinhamentos de sequências, editaram-se e conferiu-se-lhes uma codificação por cor utilizando o programa GENEDOC (versão 2.1).

### **Construção dos plasmídeos de expressão para HuMabs IgG1 anti-P-selectina**

Os genes codificando para a cadeia leve a pesada do HuMab anti-P-selectina foram montados em separado em vectores de expressão de células de mamífero.

Deste modo juntaram-se segmentos de gene codificando para a região variável ( $V_L$ ) da cadeia leve e para a região constante ( $C_L$ ) da cadeia  $\kappa$ -leve humana do HuMab anti-P-selectina, tal como os segmentos de gene o HuMab anti-P-selectina relativos à região variável da cadeia pesada ( $V_H$ ) e da região constante da cadeia  $\gamma 1$ -pesada humana ( $C_{H1}$ -Charneira- $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ).

Pode obter-se informação geral acerca das sequências nucleotídicas das cadeias leve e pesada humana a partir da qual se pode deduzir a utilização dos codões em: Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., e Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, Publicação do NIH N°. 91-3242.

A unidade de transcrição da cadeia  $\kappa$ -leve do HuMab anti-P-selectina é constituída pelos seguintes elementos:

- O incrementador imediato próximo e promotor do citomegalovírus (HCMV),
- Uma 5'-UT sintética incluindo uma sequência de Kozak,
- Uma sequência de sinal de cadeia pesada de imunoglobulina de murino incluindo o intrão de sinal de sequência,

- O cADN clonado da região variável da cadeia leve do HuMab anti-P-selectina montado com um único local de restrição *BsmI* no terminal 5' e um local doador de união e um único local de restrição *NotI* no terminal 3',
- A região constante genômica humana do gene- $\kappa$ , incluindo o intrão 2 incrementador de Ig- $\kappa$  de murganho [Picard, D., e Schaffner, W. (1984) *Nature* **307**, 80-82] e
- A sequência do sinal de  $\kappa$ -poliadenilação ("poli A") da imunoglobulina humana.

A unidade de transcrição da cadeia  $\gamma 1$ -pesada do HuMab anti-P-selectina é constituída pelos seguintes elementos:

- O incrementador imediato próximo e promotor do citomegalovírus (HCMV),
- Uma 5'-UT sintética incluindo uma sequência de Kozak,
- Uma sequência de sinal de cadeia pesada de imunoglobulina de murino incluindo o intrão de sinal de sequência,

- O cADN clonado da região variável da cadeia pesada do HuMab anti-P-selectina montado com um único local de restrição *BsmI* no terminal 5' e um local doador de união e um único local de restrição *NotI* no terminal 3',
- A região constante genômica humana do gene  $\gamma 1$ -pesado, incluindo o  $\mu$ -incrementador Ig de murganho [Neuberger, M. S. (1983) *Embo J.* **2**, 1373-1378], e
- A sequência do sinal de poliadenilação de  $\gamma 1$  ("poli A") da imunoglobulina humana.

Os elementos funcionais da cadeia  $\kappa$ -leve e da cadeia  $\gamma 1$ -pesada do HuMab anti-P-selectina e plasmídeos de expressão da cadeia: Além da cassete de expressão da cadeia  $\kappa$ -leve ou da cadeia  $\gamma 1$ -pesada do HuMab anti-P-selectina, estes plasmídeos contêm

- Um gene de resistência à higromicina
- Uma origem de replicação, *oriP*, do vírus de Epstein-Barr (EBV)
- Uma origem de replicação do vector pUC18, que permite a replicação deste plasmídeo em *E. coli*, e

- Um gene de  $\beta$ -lactamase que confere resistência à ampicilina em *E. coli*.

#### **Construção dos plasmídeos de expressão para um HuMab IgG4 anti-P-selectina**

Derivou-se um protótipo de um plasmídeo de expressão para a cadeia  $\gamma$ 4-pesada anti-P-selectina a partir do plasmídeo de expressão da cadeia  $\gamma$ 1-pesada anti-P-selectina, substituindo a região genômica humana  $\gamma$ 1-constante e a sequência do sinal de poliadenilação ("poli A") de  $\gamma$ 1-imunoglobulina pela região genômica humana  $\gamma$ 4-constante e pela sequência do sinal de poliadenilação de  $\gamma$ 4-imunoglobulina.

Para a expressão das cadeias  $\kappa$ -leves do HuMab anti-P-selectina utilizaram-se os mesmos plasmídeos de expressão que se descreveram para o IgG1 (veja-se acima).

#### **Construção dos plasmídeos de expressão para IgG1 e para IgG4 anti-P-selectina mutantes (variantes)**

Criaram-se plasmídeos de expressão codificando para mutantes das cadeias pesadas  $\gamma$ 1 e  $\gamma$ 4 anti-P-selectina por mutagênese dirigida ao local nos plasmídeos de expressão de tipo selvagem, utilizando o estojo QuickChange™ de mutagênese dirigida ao local (Stratagene).

Geraram-se os seguintes mutantes para LC1004-002. Numeram-se os aminoácidos de acordo com a numeração EU [Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U., e Waxdal, M. J. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **63**, 78-85; Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., e Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição., Publicação do NIH N°. 91-3242].

<b>TABELA 1</b>			
<b>Isotipo</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Mutações</b>	<b>Descrição</b>
IgG1	IgG1v1	PVA-236; GLPSS331 como especificado por E233P; L234V; L235A; delta G236; A327G; A330S; P331S IDNO:25	Substitui-se a sequência de tal aminoácidos da cadeia pesada $\gamma 1$ humana pela sequência de aminoácidos Pro <sub>233</sub> Val <sub>234</sub> Ala <sub>235</sub> da cadeia $\gamma 2$ humana. Substitui-se a sequência de aminoácidos Ala <sub>327</sub> Leu <sub>328</sub> Pro <sub>329</sub> Ala <sub>330</sub> Pro <sub>331</sub> da cadeia pesada $\gamma 1$ humana pela sequência de aminoácidos Gly <sub>327</sub> Leu <sub>328</sub> Pro <sub>329</sub> Ser <sub>330</sub> Ser <sub>331</sub> da cadeia pesada $\gamma 4$ humana
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A SEQ IDNO:26	Substitui-se a sequência de aminoácidos Leu <sub>234</sub> Leu <sub>235</sub> da cadeia pesada $\gamma 1$ humana pela sequência de aminoácidos Ala <sub>234</sub> Ala <sub>235</sub>
IgG4	IgG4v1	S228P; L235E SEQ IDNO:28	Substitui-se Ser <sub>228</sub> da cadeia pesada $\gamma 4$ humana por Pro <sub>228</sub> , e Leu <sub>235</sub> da cadeia pesada $\gamma 4$ humana por Glu <sub>235</sub>

### **Produção de HuMabs Recombinantes anti P-selectina**

Geraram-se HuMabs recombinantes por infecção transiente de células HEK293-EBNA aderentes (ATTC # CRL-10852) cultivadas em DMEM (Gibco) suplementado com 10 % de



IgG ultra-baixo em FCS (Gibco), 2 mM em Glutamina (Gibco), com 1 %, em volume, de aminoácidos não essenciais (Gibco) e com 250 µg/mL de G418 (Roche). Para a transfecção utilizou-se Reagente de Transfecção Fugene™ 6 (Roche) a uma razão de reagente (em µL) para ADN (em µg) de entre 3:1 e 6:1. Expressaram-se as cadeias leve e pesada de imunoglobulina provenientes de dois plasmídeos diferentes, utilizando uma razão molar de plasmídeo de codificação de cadeia leve para o de cadeia pesada de entre 1:2 e 2:1. Recolheram-se os HuMab contendo os sobrenadantes da cultura de células entre os dias 4 e 11 após a transfecção. Armazenaram-se os sobrenadantes a -20°C até serem purificados.

Pode obter-se informação geral acerca da expressão recombinante de anticorpo humanos, por exemplo em HEK293, em: Meissner, P., Pick, H., Kulangara, A., Chatellard, P., Friedrich, K., e Wurm, F. M. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 197-203.

### **Determinação da afinidade de HuMabs anti-P-selectina**

Equipamento:

Instrumento: BIACORE® 2000

Chip: CM5

Acoplamento: acoplamento de amina

Tampão: HBS (HEPES, NaCl), pH 7,4, 25°C

Para medições de afinidade acoplaram-se anticorpos Fc $\gamma$  de coelho anti-humano (Dianova) por acoplamento de amina, com a superfície do *chip* para apresentação do anticorpo contra P-selectina. Ligaram-se cerca de 400 RU de anticorpos anti P-selectina. Adicionou-se P-selectina recombinante (R&D Systems) a diversas concentrações de entre 0-50 nM. Mediu-se a associação por injeção de P-selectina durante 120 segundos; mediu-se a dissociação lavando a superfície do *chip* com tampão durante 180 segundos. Os dados de afinidade para diversos anticorpos contra P-selectina estão listados na Tabela 2. Utilizando programas Biaevaluation ajustou-se aos dados cinéticos um modelo a 1:1 de ligação de Langmuir da P-selectina ao anticorpo monoclonal apresentado.

<b>TABELA 2</b>				
<b>Dados de afinidade medidos por SPR (BIACORE® 2000)</b>				
<b>Anticorpo HuMab</b>	<b>k<sub>a</sub> (1/MS)</b>	<b>k<sub>d</sub> (1/s)</b>	<b>K<sub>A</sub> (1/M)</b>	<b>K<sub>D</sub> (M)</b>
001	6,08x10 <sup>5</sup>	4,19x10 <sup>-4</sup>	1,45x10 <sup>9</sup>	6,89x10 <sup>-10</sup>
002	8,10x10 <sup>5</sup>	2,13x10 <sup>-3</sup>	3,81x10 <sup>9</sup>	2,63x10 <sup>-9</sup>
003	6,60x10 <sup>5</sup>	2,91x10 <sup>-4</sup>	2,27x10 <sup>9</sup>	4,41x10 <sup>-10</sup>
005	8,42x10 <sup>5</sup>	2,89x10 <sup>-4</sup>	2,91x10 <sup>9</sup>	3,43x10 <sup>-10</sup>
011	1,77x10 <sup>6</sup>	2,38x10 <sup>-3</sup>	7,44x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>-9</sup>
012	1,08x10 <sup>6</sup>	1,25x10 <sup>-4</sup>	8,65x10 <sup>9</sup>	1,16x10 <sup>-10</sup>
013	1,46x10 <sup>6</sup>	2,02x10 <sup>-4</sup>	7,22x10 <sup>9</sup>	1,39x10 <sup>-10</sup>
017	7,79x10 <sup>5</sup>	1,39x10 <sup>-5</sup>	5,59x10 <sup>9</sup>	1,79x10 <sup>-11</sup>

**Actividade inibidora dos anticorpos contra P-selectina num ensaio de adesão e formação de rosetas baseado em células**

**Materiais e Métodos:**

**Ensaio de adesão de células:** No ensaio de adesão avaliou-se o efeito dos HuMabs sobre a adesão de célula HL60 semelhantes a leucócitos (ATCC CCL 240) a P-selectina que havia sido revestida sobre placas de microtitulação. Marcaram-se as células HL60 com BCECF-AM (éster acetoximetílico da 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(e -6)-carboxifluoresceína; N°. de Cat° 216254, Calbiochem). Preparou-se um revestimento de P-selectina purificada de comprimento inteiro (procedimento de purificação tal como acima) a uma concentração de 1 µg/mL num tampão contendo NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 1 mM em MgCl<sub>2</sub>, 20 mM em Tris (pH 7,4) mais 0.0005 % de Tx100, de um dia para o outro a 4°C, e placas com 96 poços (Nunc Immunoplate Maxisorp F96). Em seguida, bloquearam-se os poços com o tampão mencionado acima contendo 3,5 % de albumina de soro de bovino (BSA, Fluka) durante 2 h à temperatura ambiente (TA). Fez-se uma incubação prévia dos poços com 50 µL de diferentes diluições de HuMabs contra P-selectina ou com anticorpos murinos de referência para P-selectina (WAPS 12.2, linha de hibridoma respectiva proporcionada pela ATCC) no tampão mencionado acima contendo 1 % de BSA durante 20 minutos à TA. Adicionaram-se as células HL60 marcadas (50 µL, 70.000 células/poço) e deixaram-se ligar durante 45 minutos à TA.

Em algumas experiências incubaram-se previamente as células HL60 com 20 µg/mL de IgG1 humano durante 30 minutos antes da sua adição aos poços, para bloquear os receptores Fc. Depois de se removerem as células HL60 não ligadas por uma lavagem suave (4 vezes com o tampão mencionado acima), lisaram-se as células aderentes com 120 µL de NP-40 (Fluka; 1 % em H<sub>2</sub>O). Transferiram-se 100 µL dos sobrenadantes para placas para medir a fluorescência respectiva a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 538 nm, utilizando um espectrómetro de luminescência LS 50B (Perkin Elmer).

**Ensaio de formação de rosetas:** Para se avaliar o efeito dos anticorpos sobre a interacção das plaquetas activadas com células HL60, aplicou-se um ensaio de formação de rosetas (Jungi *et al.*, Blood **67**: 629 (1986)) em combinação com uma análise citofluorométrica com cor dupla (Evangelista, *et al.*, Blood **88**: 4183 (1996)). Prepararam-se plaquetas humanas lavadas tal como descrito (Fox *et al.*, Methods Enzymol. **215**: 45 (1992)). Activaram-se então com trombina (concentração final de 1 U/mL) durante 5 minutos e marcaram-se com um anticorpo pl-36 anti-GPIIb humano conjugado com FITC (Kouns *et al.*, J. Biol. Chem. **267**: 18844 (1992)). Em seguida incubaram-se  $1,4-2 \times 10^6$  plaquetas em 70 µL de solução tyrode com diferentes diluições de HuMabs (100 µL) às escuras e durante 30 minutos à TA. Adicionaram-se 50 µL de suspensão de células HL60 (em solução tyrode) ajustadas a  $20 \times 10^6$ /mL. Marcaram-se as células HL60 por incubação com 20 µL de um anticorpo anti-humano CD45 Ab

(Código N°. 555483, Pharmingen) conjugado com PE (ficoeritrina). Depois de se incubarem as células HL60 marcadas com as plaquetas e os HuMabs durante 30 minutos à temperatura ambiente em tubos FACS (Becton Dickinson), analisou-se a formação de agregados mistos ou de rosetas medindo tanto as plaquetas como a fluorescência do marcador das células HL60 utilizando um FACScan (Becton Dickinson). Adquiriram-se os sinais de dispersão longitudinal e lateral, como os sinais verde (FITC) e vermelho (PE) por amplificação logarítmica com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e comprimentos de onda de emissão respectivamente de 530 nm (FITC) e 570 nm (PE). Utilizou-se uma compensação electrónica para remover a sobreposição espectral. Identificaram-se as células HL60 com base na dispersão longitudinal e lateral. A aquisição electrónica dos acontecimentos identificados como devidos a células HL60 foi levada a cabo para excluir plaquetas por si sós. Mediram-se cinco mil acontecimentos ligados a células HL60 para cada amostra. Utilizou-se uma amostra em que se recorreu a plaquetas não activadas ou activadas com trombina misturadas com células HL60 na presença de EDTA (a 10 mmol/L) para se definir um limiar da escala de fluorescência verde. A percentagem de células HL60 acima do limiar representa a percentagem de plaquetas ligadas a células HL60. O desvio da fluorescência do marcador das plaquetas para valores de fluorescência menores reflecte a diminuição do número de agregados mistos com um maior número de plaquetas aderentes, a favor de um aumento do

número de agregados mistos com um baixo número de plaquetas aderentes.

### **Resultados:**

No ensaio de adesão a células HL60 os anticorpos de P-selectina inibiam a adesão das células HL60 a P-selectina purificada com valores de  $IC_{50}$  na gama de entre 0,08 - 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Embora as mutações fossem introduzidas na parte Fc do anticorpo, tanto as variantes IgG4 como IgG1 de HuMabs eram mais potentes do que o anticorpo de origem, com valores de  $IC_{50}$  de entre 0,08 - 0,11  $\mu\text{g/mL}$ , tal como se ilustra na Fig.1. Quando se fazia uma incubação prévia das células HL60 com IgG1 humano, a potência dos anticorpos de origem não mudados também aumentava diminuindo-se em cerca de 3 a 4 vezes o seu valor de  $IC_{50}$ , tal como se demonstra para o HuMab 002 na Fig.1. Esta constatação sugere que a maior eficácia dos mutantes no ensaio de adesão se deve sobretudo à eliminação da adesão das células HL60 à P-selectina através da parte Fc do anticorpo aos receptores  $Fc\gamma$ .

No ensaio de formação de rosetas avaliando a adesão de plaquetas humanas activadas expressando P-selectina a células HL60, os valores de  $IC_{50}$  do HuMabs eram ainda menores do que os obtidos no ensaio de adesão devido ao menor número de receptores de P-selectina neste ensaio ( $IC_{50}$ : 0,05 - 0,3  $\mu\text{g/mL}$ , preferivelmente entre 0,05 e 0,2  $\mu\text{g/mL}$ ). A eficácia das variantes de Fc dos HuMabs

respectivos tende a aumentar em comparação com a do anticorpo de origem não mutado (Fig. 2). Uma incubação prévia das células HL60 com IgG1 e IgG4 antes da incubação com as plaquetas activadas não afectou significativamente a actividade inibidora tanto dos mutantes como do anticorpo de origem, indicando um papel menos pronunciado da ligação mediada pelo receptor Fc $\gamma$  no ensaio de formação de rosetas, em comparação com o ensaio de adesão.

#### **Reactividade cruzada dos anticorpos contra P-selectina com a P-selectina de espécies animais**

**Materiais e Métodos:** Avaliou-se a reactividade cruzada dos HuMabs de P-selectina medindo (i) a ligação dos HuMabs a plaquetas activadas de rato e de macaco cinomólogo utilizando análise FACS e (ii) a sua actividade inibidora no ensaio de formação de rosetas avaliando a adesão das plaquetas de rato e de cinomólogo a células HL60.

Para medir a ligação aos HuMabs de plaquetas activadas de rato e de cinomólogo, prepararam-se plaquetas de rato e de cinomólogo lavadas tal como se haviam preparado as plaquetas humanas lavadas (veja-se acima). Elas foram activadas com trombina (concentração final de 1 U/mL) durante 5 minutos. Incubaram-se as plaquetas activadas com diferentes diluições dos HuMabs (20  $\mu$ L) durante 30 minutos à TA. Depois de se ligarem aos HuMabs, fixaram-se as plaquetas com PFA a 2 % à TA durante 15 minutos. Lavaram-se amostras com tampão de tyrode e

voltaram a suspender-se em 300 mL de tyrode. Detectou-se a ligação dos HuMabs com um fragmento  $F(ab')_2$  de IgG de coelho anti-humano conjugado com FITC (Código N°. F0056, Dako). A título de controlo utilizou-se como anticorpo inibi tório da P-selectina de rato um anticorpo policlonal anti-P-selectina de coelho anti-humano (Código N°. 09361A, Pharmingen).

Para se medir o efeito inibitório dos HuMabs para P-selectina no ensaio de formação de rosetas, prepararam-se plaquetas lavadas de rato e de cinomólogo tal como se descreveu acima para as plaquetas humanas. Levou-se a cabo o ensaio de formação de rosetas essencialmente tal como se descreveu para as plaquetas humanas. Para a marcação das plaquetas de cinomólogo utilizou-se o anticorpo pl-36 anti-humano GPIIb conjugado com FITC, enquanto as plaquetas de rato foram marcadas com o anticorpo murino anti-rato CD61 conjugado com FITC (Código N°. 554952, Pharmingen).

Resultados: Nenhum dos anticorpos específicos para P-selectina da invenção que inibem funções mediadas por P-selectina humana demonstrou ligar-se à P-selectina de rato ou inibir a formação de agregados mistos constituídos por plaquetas de rato e células HL60, tal como se mostra para alguns exemplos na Fig. 3a. No entanto, os HuMabs contra a P-selectina ligam-se a e inibem a P-selectina de cinomólogo (Fig. 3b).



**Selectividade dos anticorpos contra P-selectina em relação à E-selectina e à L-selectina**

Materiais e Métodos: Determinou-se a selectividade dos HuMabs para P-selectina em relação a E-selectina e a L-selectina numa medição por ELISA isento de células, medindo a ligação dos anticorpos a E-selectina e a L-selectina recombinantes (ADPI e ADP2, R&D Systems) e num ensaio ELISA baseado em células, medindo a ligação dos anticorpos a transfectantes de E-selectina-CHO e de L-selectina-300.19 (os transfectantes foram gerados tal como se descreveu em Goetz *et al.*, J. Cell. Biol. **137**: 509 (1997); Ley *et al.*, Blood **82**: 1632 (1993)).

No ensaio ELISA isento de células revestiram-se placas de microtitulação (Nunc Immunoplate Maxisorp F96) de 96 poços de um dia para o outro com P-selectina, E-selectina ou L-selectina recombinantes, a uma concentração de 1, µg/mL num tampão contendo NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Tris 20 mM (pH 7,4) e 0,0005 % de Tx100, a 4°C. Em seguida, bloquearam-se os poços com o tampão mencionado acima contendo 3,5 % de albumina de soro de bovino (BSA, Fluka) durante 2 h à TA. Fizeram-se incubações prévias dos poços com 50 µL de diversas concentrações dos HuMabs de P-selectina ou com anticorpos murinos de referência contra P-selectina ou E-selectina A26; R&D Systems) e anticorpo de cabra contra L-selectina (AF728; R&D Systems) no tampão mencionado acima contendo 1 % de BSA, de um dia para o outro à TA. Detectou-se a ligação aos HuMabs utilizando um

IgG anti-humano biotinilado (Amersham, RPN1003, concentração final de 1:1.000) ou para anticorpos de controlo os correspondentes IgG biotinilados anti-murganho ou anti-cabra. Passada 1 h de incubação, lavaram-se os poços (3 vezes) com o tampão mencionado acima, e com 0,1 mL de complexo de estreptavidina-peroxidase biotinilada (Amersham, RPN1051), diluído a 1:750 no tampão mencionado contendo 0,1 % de BSA e adicionado por 30 minutos. Lavaram-se então os poços e adicionou-se 0,2 mL da solução substrato da peroxidase contendo ABTS (sulfonato de 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina, Boehringer, Mannheim) (solução de reserva de ABTS: 1 mL de ABTS 40 mM, 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 % e 20 mL de acetato de sódio 0,1 M, 0,05 de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Parou-se a reacção passados cerca de 10 minutos utilizando 50 µL de citrato 0,1 M que também continha 0,01 % de NaN<sub>3</sub>. Leu-se a reacção corada a 405 nm.

No ensaio ELISA baseado em células, semearam-se os transfectantes de P-selectina e de E-selectina-CHO, depois de libertar as células com solução de dissociação de células (Sigma C5914), nos diversos poços de placas de microtitulação de 96 poços (TC Microwell F96 Nunc 167008) ajustando-se a 100.000 células/poço, e cultivaram-se nos meios respectivos de um dia para o outro a 37°C (meio para os transfectantes P-CHO: DMEM + 10 % de FCS + Glutamina 2 mM + 100 U/mL de Penicilina + 100 µg/mL de Estreptomicina; meio para os transfectantes de E-selectina: HAM F-12 + 10 % de FCS + Glutamina 2 mM + Penicilina 100 U/mL + 100 µg/mL de Estreptomicina + 0,1 % de Fungizona + 100 µg/mL de

Neomicina). Depois da remoção dos meios e de se bloquearem os poços com tampão A-T (150 mM em NaCl, 1 mM em CaCl<sub>2</sub>, 1 mM em MgCl<sub>2</sub>, 20 mM em Tris (pH 7,4)) contendo 3 % de TopBlock (Código N°. TB232010; Juro) durante 1 h, adicionaram-se-lhes 50 µL de diversas diluições diferentes dos HuMabs de P-selectina ou dos anticorpos murinos de referência contra P-selectina e E-selectina (veja-se acima) no tampão mencionado acima contendo 1 % de TopBlock e 0,1 % de azida, e incubou-se durante 60 minutos à TA. Depois de se lavarem os poços (4 vezes), detectaram-se os anticorpos ligados utilizando-se os mesmos passos que se mencionaram acima para o ELISA isento de células.

Uma vez que as células L-selectina-300.19 são células em suspensão, o formato de ELISA com base em células teve que ser modificado plaqueando as células L-selectin-300.19 transfectantes sobre os poços de placas filtrantes de 96 poços em poliestireno (Corning 3510). Utilizando as placas filtrantes removeram-se as soluções de bloqueio e de incubação por filtração através do fundo dos poços, mas de resto o protocolo era semelhante ao que recorria a células de P-selectina e E-selectina-CHO. A título de controlos utilizaram-se CHO não transfectadas e 300.19.

### **Resultados:**

Os anticorpos da invenção eram fortemente selectivos contra E-selectina e L-selectina. Eles ligavam-

se a células P-selectina-CHO com valores de  $EC_{50}$  na gama de entre 0,01 e 0,08  $\mu\text{g/mL}$ , preferivelmente na gama de entre 0,01 e 0,04  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto os valores de  $EC_{50}$  para células E-selectina-CHO e para L-selectina-300.19 eram claramente superiores a 50  $\mu\text{g/mL}$ , preferivelmente maiores do que 100  $\mu\text{g/mL}$ . O HuMab 002 apresentava a maior selectividade, com um factor de selectividade em relação às células E-selectina e às de L-selectina, maior do que 4.000 vezes no ELISA baseado em células. Além disto, o HuMab 002 não se liga a transfectantes com E-selectina e com L-selectina acima dos níveis de base, até uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . A selectividade das variantes de Fc IgG4v1 e IgG1v1 do HuMab 002 é semelhante à do HuMab 002 de origem (Figs. 4a-c).

**Actividade inibidora ex vivo de anticorpos contra P-selectina num sistema de fluxo de sangue humano inteiro**

**Efeito de HuMabs contra P-selectina sobre a adesão de leucócitos a uma monocamada de plaquetas**

***Materiais e Métodos:***

Para se tratar do efeito dos anticorpos anti-P-selectina sobre o recrutamento de leucócitos para locais aonde existam lesões das paredes dos vasos sanguíneos e trombos com plaquetas, utilizou-se um sistema de fluxo de sangue humano que permitia a medição da interacção entre leucócitos humanos e plaquetas humanas a diferentes tensões

de corte essencialmente como se descreveu (Kirchhofer *et al.*, Blood **89**: 1270 (1997)). Num dispositivo de perfusão de pratos paralelos perfundi-se sangue humano inteiro obtido da veia antecubital de um doador saudável através de uma superfície de colagénio simulando uma parede de um vaso lesionado desnudado. Prepararam-se superfícies revestidas a colagénio tal como descrito (Kirchhofer *et al.*, Blood **89**: 1270 (1997)). Elas foram posicionadas em três câmaras de placas de perfusão paralelas. Para permitir a medição de diferentes tensões de corte (65/s e 280/s), utilizaram-se câmaras de perfusão com diferentes dimensões e perfundi-se o sangue sobre as superfícies revestidas a colagénio a um caudal constante de sangue de 1 mL/minuto, que se controlou com bombas de roletes individuais posicionadas distais em relação ao dispositivo de perfusão. Imediatamente depois de se obter o sangue da veia e de se repartir o sangue por três tubagens, adiciona-se-lhe um inibidor CPIIb/IIIa (0,5  $\mu$ mol/*lamifiban*) para evitar a agregação de plaquetas e para gerar monocamadas de plaquetas. Ao mesmo tempo, foram administrados os anticorpos anti-P-selectina (os HuMabs, mutantes, anticorpos de referência respectivos ou IgG1 e IgG4 humanos como controlos) a diversas concentrações e a mistura de sangue com inibidor entrava então na câmara de perfusão contendo as superfícies revestidas com colagénio. Após um período de perfusão de 5,5 minutos, perfunde-se PBS através da câmara de perfusão sem se interromper o caudal, durante 3 minutos. Após uma breve interrupção do caudal, fixaram-se as câmaras com paraformaldeído a 3 % em PBS a 1 mL/minuto durante 2 minutos. Em seguida removeram-se as

superfícies revestidas das câmaras, fixaram-se de novo durante 1 h em paraformaldeído a 3 % em PBS a 4°C e armazenaram-se em PBS com 0,03 % de azida de sódio. Para se avaliar o número de leucócitos aderentes à monocamada de plaquetas, depois de se secarem as superfícies revestidas ao ar, contrastaram-se com solução Diff-Quick (Dade Behring AG) e embeberam-se em Merckoglas (Merck, Alemanha). Utilizou-se um sistema de análise de imagem (MCID, Imaging Research Inc.) para determinar o número de leucócitos aderentes a uma área padrão orientada na perpendicular ao caudal de sangue a uma distância de 1 mm do início das superfícies. A tensões de corte de 65/s e de 280/s, a área relativamente à qual se contaram os leucócitos era de, respectivamente, 3,1 mm<sup>2</sup> e de 2,1 mm<sup>2</sup>.

### **Resultados:**

Os HuMabs para P-selectina inibiam a adesão de leucócitos à monocamada de plaquetas de uma forma dependente da concentração. A uma tensão de corte de 65/s e a uma concentração de 10 µg/mL os HuMabs inibiam a adesão dos leucócitos em 60 - 99 %, preferivelmente 70-99 %. O efeito inibidor dos HuMabs era mais pronunciado à maior tensão de corte de 280/s (mais semelhante à situação arterial), em comparação com a tensão de corte venosa de 65/s. Globalmente, a uma tensão de corte de 280/s o número leucócitos aderentes era menor do que a 65/s. Quando se comparavam as variantes Fc com os anticorpos de origem respectivos, eles tinham actividades inibidoras semelhantes

na câmara de perfusão *ex vivo*, tal como se demonstrou para o HuMab 002 e as suas variantes IgG4v1 e IgG1v1 (Fig. 5). A maior actividade inibidora dos mutantes em relação ao anticorpo de origem, que se encontrou nos ensaios *in vitro*, não foi observada na câmara de perfusão *ex vivo* o que se pode dever à saturação dos receptores Fc $\gamma$  dos leucócitos no sangue humano inteiro.

### **Efeito dos HuMabs de P-selectina sobre a adesão de leucócitos a células endoteliais**

#### ***Materiais e Método.***

Para tratar o potencial anti-inflamatório dos HuMabs da P-selectina em condições de tensão de corte, utilizou-se o sistema mencionado acima de caudal de sangue humano montado com células endoteliais recobrando as superfícies. Isolaram-se células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) provenientes de cordões umbilicais, por digestão com colagenase de Tipo II (Roche Suíça) de acordo com o método de Jaffe *et al*, 1993 (Por favor adicionar citação integral). Cultivaram-se em frascos de cultura de tecidos revestidos com gelatina a 1 %, em meio 199 (M199, Sigma, Alemanha) suplementado com 20 % de soro fetal de vitelo (Gibco, Auckland), 100 IU/mL de penicilina (Gibco, Auckland), 0,1 mg/mL de estreptomicina (Gibco, Auckland), 2 mmol/L de L-glutamina (Gibco, Auckland), 10 U/mL de heparina (Sigma) e 50  $\mu$ g/mL de suplemento EC para crescimento (Sigma, Alemanha). Deixaram-

se as HUVEC crescer até à confluência (cerca de 4 dias), passajaram-se com tripsina/ácido etilenodiaminotetraacético (Gibco, Auckland) e semearam-se sobre superfícies plásticas Thermanox (a cerca de 200.000 EC/superfície), que se haviam previamente revestido com gelatina a 1 % (Fluka, Alemanha). Deixaram-se as HUVEC sedimentar e tornar-se confluentes ao longo de 1-2 dias. Elas foram estimuladas com 20 ng/mL de IL-4 (R&D Systems) 24 h antes do início da perfusão, e com histamina  $10^{-4}$  M (Fluka, Alemanha) 5-10 minutos antes da perfusão. Cada experiência foi levada a cabo com as HUVEC da passagem 1. Posicionaram-se as superfícies com monocamadas confluentes de HUVEC estimuladas nas câmaras de perfusão com placas paralelas, tal como se descreveu acima. De um modo semelhante às experiências de perfusão descritas acima, retirou-se sangue inteiro de doadores saudáveis. No entanto, nestas experiências, tratou-se o sangue com anticoagulante, um inibidor de trombina, Ro-46-6240 (10  $\mu$ M) e fez-se uma incubação prévia com diversas concentrações diferentes dos anticorpos anti-P-selectina (HuMabs, mutantes, anticorpos de referência respectivos) ou com IgG1 e IgG4 humanos como controlos, durante 5 minutos logo antes da perfusão sobre as células endoteliais activadas. Ajustou-se o caudal de sangue a 1 mL/minuto, a tensão de corte a 65/s e o período de perfusão a 5,5 minutos. Depois de um período de 3 minutos de lavagem com PBS, fixaram-se as HUVEC com os leucócitos aderentes com paraformaldeído a 3 % durante 2 minutos nas mesmas condições de caudal que se descreveram. Em seguida removeram-se as superfícies das câmaras,



enxaguaram-se com solução de fixação fresca durante 1 h, e armazenaram-se em PBS com 0,02 % de azida de sódio. Para uma análise morfométrica, contrastaram-se os leucócitos com um anticorpo de murganho contra o antigénio comum dos leucócitos CD45, que havia sido anteriormente marcado utilizando uma imunoglobulina modificada biotinilada anti-murganho (Animal Research Kit, Dako, EUA). Contra-contrastaram-se os núcleos com hematoxilina (J.T Baker, Holanda).

### **Resultados:**

A estimulação das HUVEC com a combinação de IL-4 e histamina resultou na expressão da P-selectina e na adesão dos diferentes tipos de leucócitos constituindo os granulócitos (incluindo PMN e eosinófilos) a parte principal dos leucócitos aderentes. Os HuMabs da invenção inibiam a adesão da população total de leucócitos em 60-90 %, a 3 µg/mL. Globalmente a actividade inibidora das variantes de Fc não era significativamente diferente da dos HuMabs não mutados.

Os HuMabs da P-selectina demonstram um efeito diferencial em relação aos diferentes subtipos de leucócitos. O efeito sobre granulócitos é mais pronunciado em comparação com os leucócitos mononucleares. Os anticorpos de acordo com a invenção inibiam a adesão de granulócitos (incluindo PUNS e eosinófilos) em 90-99 %, de monócitos em 50-88 %, e de linfócitos em 5-40 %. A

diminuição respectiva nos números absolutos dos diferentes tipos de leucócitos é dada de forma representativa para o IgG4v1 na Fig. 6.

### Potencial dos HuMabs para P-selectina na activação do sistema complemento

#### **Elisa de ligação a C1q e a C3 $\epsilon$ :**

Para se determinar a capacidade dos anticorpos da invenção para induzir ligação a C1q e activação de C3, utilizou-se uma metodologia ELISA. O C1q é parte do sistema imunológico adaptativo e, ligando-se a complexos imunológicos, despoleta a activação sequencial de diversos zimogénios. Os enzimas por sua vez, provocam a clivagem de moléculas C3, podendo resultar na iniciação de reacções inflamatórias, na opsonização de partículas estranhas ou aberrantes, e na lise de membranas celulares.

Em princípio, a placa de ELISA é revestida com gamas de concentrações do anticorpo, a que se adiciona C1q humano ou soro humano de mistura, como fonte de C3. A ligação a C1q ou a C3 $\epsilon$  é detectada por um anticorpo dirigido contra C1q humano ou C3 $\epsilon$ , e em seguida um conjugado marcado com peroxidase.

Testou-se HuMab 002 (o material do hibridoma e o derivado do transfectoma transiente, as suas variantes mutantes, e os anticorpos de controlo, a concentrações de

entre 0,16-20  $\mu\text{g/mL}$ . A título de controlo negativo utilizou-se um IgG4 humano (CLB, Holanda, solução de reserva a 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ), que se liga muito fracamente a Clq. Incorporou-se IgG1 humano (Sigma, solução de reserva a 2  $\mu\text{g/mL}$ ) a título de controlo positivo. Para a detecção de Clq, utilizaram-se um anticorpo de coelho dirigido contra Clq (Dako) e um anticorpo IgG de suíno anti-coelho, conjugado com peroxidase de raiz-forte (Sigma). Para a detecção de C3 $\epsilon$  utilizou-se um anticorpo murino anti-humano C3 e um anticorpo IgG de coelho anti-murganho, conjugado com peroxidase de raiz-forte (Sigma).

Os cálculos relativos a valores de  $EC_{50}$  ou a ligações máximas, a 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $B_{\text{max}}$ ) do HuMab testado, foram determinados utilizando o ajuste de curvas não linear por regressão (ligação a um local) utilizando os programas Graphpad Prism.

### **Resultados:**

O HuMab 002 de acordo com a invenção era capaz de se ligar eficazmente a Clq, tal como o indicaram os seus valores de  $EC_{50}$  de 0,946  $\mu\text{g/mL}$  e de 1,159  $\mu\text{g/mL}$ , e os valores de  $B_{\text{max}}$  ( $DO_{405}$ ) de 0,987 e 0,711, respectivamente para material derivado do hibridoma e do transfectoma. Tal como era de esperar, o controlo negativo, IgG4 humano, não se ligava a Clq, tal como indicado por um valor de  $B_{\text{max}}$  de 0,222 a  $DO_{405}$ . No entanto, todas as três variantes de Fc que se testaram (IgG4v1, IgG1v1, IgG1v2) tinham perdido a

capacidade de se ligarem a C1q, tal como o demonstravam os seus valores de  $B_{max}$  e  $DO_{405}$  de, respectivamente, 0,132, 0,119, e 0,132 (Tabela 3). Em linha com as capacidades de ligação a C1q, a deposição de C3 sobre HuMab 002 (derivado de hibridoma e de transfectoma), ocorria de um modo dependente da concentração em anticorpo, e com valores de  $EC_{50}$  de entre 2,7  $\mu\text{g/mL}$  e 8,3  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, todas as três variantes Fc eram incapazes de iniciar a deposição de C3, tal como o indicavam, os seus valores de  $B_{max}$  e  $DO_{405}$  de respectivamente 0,104, 0,156 e 0,133 (Tabela 3).

Quando o HuMab 002 interacciona com componentes do complemento, este anticorpo tem o potencial intrínseco para induzir CDC *in vivo*. Portanto a parte Fc deste anticorpo é modificada de acordo com a invenção.

<b>TABELA 3</b>					
		<b>ELISA para EC1q</b>		<b>ELISA para C3</b>	
		<b><math>B_{max}</math></b>	<b>(<math>DO_{405}</math> fundo</b>	<b><math>B_{max}</math></b>	<b>(<math>DO_{405}</math> fundo</b>
		<b>a</b>	<b>10 (<math>DO_{405}</math>)</b>	<b>a</b>	<b>10 (<math>DO_{405}</math>)</b>
		<b><math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>		<b><math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	
HuMab	002				
(hibridoma)		0,987	0,079	4,47	0,098
IgG4v1		0,132		0,104	
IgG2v1		0,119		0,156	
IgG1v2		0,132		0,133	
HuMab	002				
(transiente)		0,711		4,071	
IgG4		0,222		0,182	

**Potencial dos HuMabs de P-selectina para se ligarem a receptores Fcγ**

Os efeitos de citotoxicidade dependente do anticorpo IgG são mediados pelos receptores Fcγ nas células efectivadoras. Estudou-se a ligação de HuMab 002 derivado de hibridoma e de transfectoma, bem como das variantes mutantes e de anticorpos de controlo contra FcγR expresso em células efectivadoras de sangue humano, por análise FACS.

**Materiais e métodos:**

Incubaram-se transfectantes de FcγRI IIA1.6 ou células efectivadoras isoladas de fresco com anticorpos, e detectou-se a ligação de anticorpo com F(ab)<sub>2</sub> de IgG de coelho-anti-humano marcado com FITC (DAKO), ou com F(ab)<sub>2</sub> de IgG de coelho-anti-humano marcado com FITC (BD/Pharmingen). Testaram-se HuMab 002 (material transiente, derivado de transfectoma e/ou de hibridoma, e variantes mutantes) a uma concentração de 1 µg/mL (transfectantes IIA1.6) ou de 10 µg/mL (células efectivadoras). A ausência de anticorpo primário ou de IgG4 humano (a 10 µg/mL) foi utilizada como controlo negativo. Para se detectar a expressão de FcγRI em células IIA1.6, utilizou-se CD64 de murganho anti-humano marcado com FITC (BD/Pharmingen). Em experiências utilizando células mononucleares de sangue periférico enriquecidas em células NK, identificaram-se as células NK por dupla contrastação

utilizando CD65 de murganho anti-humano marcado com PE (BD/Pharmingen). Identificaram-se os granulócitos e monócitos com base nos seus perfis de FSC/SSC.

Incubaram-se células IIA1.6, transfectante IIA1.6-Fc $\gamma$ RI e células efectivadoras isoladas de fresco, com anticorpos. Detectou-se a ligação a anticorpo com F(ab)<sub>2</sub> de Rb- $\alpha$ -huIgG marcado com FITC (DAKO), ou com F(ab)<sub>2</sub> de Rb- $\alpha$ -huIgG marcado com FITC (BD/Pharmingen).

Testou-se o HuMab 002 (material transiente de transfectoma, derivado de hibridoma e de variantes mutantes) a uma concentração de 1  $\mu$ g/mL, no ensaio de ligação do transfectante IIA1.6-Fc $\gamma$ RI. Utilizaram-se a título de controlo negativo células IIA1.6 de tipo selvagem. A título de controlo para a expressão de Fc $\gamma$ RI utilizou-se m- $\alpha$ -huCD64-FITC (BD/ Pharmingen).

Testou-se o HuMab 002 (material transiente de transfectoma, derivado de hibridoma e de variantes mutantes) a uma concentração de 10  $\mu$ g/mL nos ensaios de ligação a células efectivadoras. Não se testou material transiente de transfectoma no ensaio de ligação a granulócitos. Utilizou-se IgG4 (a 10  $\mu$ g/mL) a título de controlo negativo em todos os ensaios de ligação com células efectivadoras, com excepção do ensaio de ligação a granulócitos.

Enriqueceu-se sangue inteiro em células NK utilizando um estojo para isolamento de NK (Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega). Identificaram-se as células NK por contrastação com m- $\alpha$ -huCD56-FITC.

Obtiveram-se PBMC (células mononucleares do sangue periférico) a partir de sangue inteiro utilizando um procedimento com Ficoll tal como se encontra descrito no protocolo incluído no estojo de isolamento de NK (Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega). Identificaram-se os monócitos com base no seu perfil FSC/SSC. Isolaram-se os granulócitos a partir de sangue inteiro utilizando tampão de lise FACS e identificaram-se com base no seu perfil FSC/SSC.

Incubaram-se células efectivadoras isoladas de fresco com anticorpos, e detectou-se a ligação ao anticorpo com F(ab)<sub>2</sub> de IgG de coelho-anti-humano marcado com FITC (DAKO), ou com F(ab)<sub>2</sub> de IgG de coelho-anti-humano marcado com FITC (BD/Pharmingen). Testaram-se HuMab 002 (material transiente de transfectoma e/ou derivado de hibridoma, e variantes mutantes) a uma concentração de 10  $\mu$ g/mL. A ausência de anticorpo primário ou de IgG4 humano (a 10  $\mu$ g/mL) foi utilizada a título de controlo negativo. Isolaram-se as células NK a partir de amostras de MNC com um estojo de isolamento de NK (Miltenyi Biotec, EUA). Nas experiências utilizando células mononucleares de sangue periférico enriquecido em células NK, identificaram-se as células NK por dupla contrastação utilizando CD56 de murganho-anti-humano marcado com PE (BD/Pharmingen).

Isolaram-se os granulócitos e os monócitos de acordo com o estado da técnica, a partir de PBMC (por exemplo o estojo de isolamento de monócitos (Miltenyi, veja-se acima). Identificaram-se os granulócitos e os monócitos com base nos seus perfis FSC/SSC.

### **Resultados:**

O HuMab 002 de acordo com a invenção era capaz de se ligar a FcR tal como o indicava a sua ligação a granulócitos, monócitos e células NK. Todas as três variantes Fc que se testaram (IgG4v1, IgG1v1 e IgG1v2) tinham perdido por completo a capacidade de se ligarem a células NK (Tabela 4). Além disto, o HuMab 002 ligava-se eficientemente a granulócitos e a monócitos, enquanto as variantes mutantes mostravam níveis de ligação comparáveis aos na ausência de anticorpo primário ou de IgG4 humano, tal como indicado pelas percentagens de células ligadas ao anticorpo nas Tabelas 5 e 6. Isto indica que as variantes mutantes perderam a capacidade de interactuar com FcR nas células efectivadoras.

Tal como o HuMab 002 interactua eficientemente com FcR, este anticorpo tem um potencial intrínseco para induzir citotoxicidade dependente do anticorpo *in vivo*. A inactivação da interacção com FcR tal como levada a cabo para as variantes Fc de acordo com a invenção evita a ADCC de um modo eficaz.



<b>TABELA 4</b>		
<b>Anticorpo</b>		<b>Ligação a células NK (% de células NK ligadas ao anticorpo)</b>
Sem anticorpo		0,03
HuMab	002	90,92
(hibridoma)		
HuMab	002	37,40
(transiente)		
IgG4 humano		0,06
IgG4v1		0,06
IgG1v1		0,12
IgG1v2		0,00

<b>TABELA 5</b>		
<b>Anticorpo</b>		<b>Ligação a monócitos (% de monócitos ligados ao anticorpo)</b>
Sem anticorpo		8,5
HuMab	002	38,4
(hibridoma)		
HuMab	002	31,3
(transiente)		
IgG4 humano		9,4
IgG4v1		14,5
IgG1v1		12,3
IgG1v2		14,0

<b>TABELA 6</b>		
<b>Anticorpo</b>		<b>Ligação da granulócitos (% de granulócitos ligados ao anticorpo)</b>
Sem anticorpo		1,2
HuMab	002	63,6
(hibridoma)		
IgG4v1		1,6
IgG1v1		2,1
IgG1v2		2,0

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> ANTICORPOS ANTI-P-SELECTINA

<130> 22354WO

<160> 52

<170> Patente na versão 3.2

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1                   5                   10                   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
          20                   25                   30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
          35                   40                   45

Ser Gly Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys  
          50                   55                   60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
65                   70                   75                   80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
          85                   90                   95

Arg Gly Arg Ile Ser Met Asp Arg Gly Val Lys Asn Asn Trp Phe Asp  
          100                   105                   110

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

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
                  20                   25                   30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
          35                   40                   45

Ser Ala Ile Thr Ala Ala Gly Asp Ile Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys  
      50                   55                   60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
65                   70                   75                   80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
          85                   90                   95

Arg Gly Arg Tyr Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp  
          100                   105                   110

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

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
          35                   40                   45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
          100                   105

<210> 6

<211> 128

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
          20                   25                   30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val  
          35                   40                   45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Phe Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
          50                   55                   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser  
65                   70                   75                   80

Leu Leu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
          85                   90                   95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Tyr Tyr  
          100                   105                   110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
          115                   120                   125

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gln Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8



Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1                   5                   10                   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu  
20                   25                   30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35                   40                   45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe  
50                   55                   60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65                   70                   75                   80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85                   90                   95

Ala Thr Asp Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
100                   105                   110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
                  20                                   25                                   30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50                                   55                                   60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65                                   70                                   75                                   80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro  
                  85                                   90                                   95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
          100                                   105

<210> 10

<211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu  
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Thr Asp Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
          20                   25                   30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
          50                   55                   60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65                   70                   75                   80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro  
          85                   90                   95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
          100                   105

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Phe Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser  
65 70 75 80

Leu Leu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Tyr Tyr  
100 105 110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 14

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Gly Arg Phe Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp  
100 105 110

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

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
          35                   40                   45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
          100                   105

<210> 16

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16



Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1                   5                   10                   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
          20                   25                   30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
          35                   40                   45

Ser Ala Ile Ser Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys  
          50                   55                   60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
65                   70                   75                   80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
          85                   90                   95

Arg Gly Arg Phe Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp  
          100                   105                   110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115                   120

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
          20                   25                   30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
          50                   55                   60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65                   70                   75                   80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Asn Trp Pro Leu  
          85                   90                   95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
          100                   105

<210> 18

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Gly Arg Phe Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp  
100 105 110

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

<210> 19

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1                   5                   10                   15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
          20                   25                   30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65                   70                   75                   80

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

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
          100                   105

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Asn Trp Ile Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 22

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Gln Pro Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Asn Thr Leu Thr Glu Leu  
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ala Ile Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Thr Asp Leu Ala Gly Gly Ser Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp  
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

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

- <210> 24
- <211> 330
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <400> 24



Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 25

<211> 329

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
195 200 205

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 26

<211> 330

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180

185

190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 27

<211> 327

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255



Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 28

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Ser	Tyr	Asp	Met	His
1				5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

Asn	Tyr	Asp	Met	His
1				5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

Ser	Tyr	Gly	Met	His
1				5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Glu Leu Ser Met His  
1 5

<210> 33  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Gly Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 34  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Ala Ile Thr Ala Ala Gly Asp Ile Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 35  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Phe Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

- <210> 36
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

<400> 36

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

- <210> 37
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

<400> 37

Ala Ile Ser Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly  
1 5 10 15

- <210> 38
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

<400> 38

Gly Arg Ile Ser Met Asp Arg Gly Val Lys Asn Asn Trp Phe Asp Pro  
1 5 10 15

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

Gly Arg Tyr Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp Pro  
1 5 10 15

<210> 40

<211> 19

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly  
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Asp Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 42  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Gly Arg Phe Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp Pro  
1 5 10 15

<210> 43  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 44  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
1 5 10



<210> 45  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 46  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Leu Thr  
1 5

<210> 48  
<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Val Thr  
1 5 10

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 52

Gln Gln Arg Tyr Asn Trp Pro Leu Thr  
1 5

Lisboa, 5 de Abril de 2013.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Um anticorpo que se ligue a P-selectina, não se ligue ao factor complemento C1q e não se ligue a receptores Fc $\gamma$  em células NK, contendo uma parte Fc derivada de uma origem humana, **que seja caracterizado por** ser um anticorpo da subclasse IgG4 humana, em que S228 esteja substituído por P e L235 esteja substituído por E, por inibir a adesão de células HL60 semelhantes a leucócitos a P-selectina purificada com um valor de IC<sub>50</sub> de entre 0,08 e 0,5  $\mu$ g/mL e por incluir as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 do domínio variável da cadeia leve definidas pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 e as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 do domínio variável da cadeia pesada definidas pela SEQ ID NO: 4.

2. O anticorpo da reivindicação 1, **caracterizado por** ser um anticorpo humano ou humanizado.

3. O anticorpo da reivindicação 1 ou da 2, incluindo o domínio variável da cadeia leve definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 e o domínio variável da cadeia pesada definido pela sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

4. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a região constante da cadeia pesada humana inclua a sequência de aminoácidos da SEQ ID

NO: 28 e a região constante da cadeia leve  $\kappa$  seja tal como definida na SEQ ID NO: 23.

5. Uma molécula de ácido nucleico codificando para uma molécula de anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Um vector incluindo a molécula de ácido nucleico da reivindicação 5.

7. Uma célula hospedeira que inclua o vector da reivindicação 6.

8. Um método para a preparação de uma molécula de anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, que inclua cultivar-se a célula hospedeira da reivindicação 7 em condições que permitam a síntese da referida molécula de anticorpo e recuperar-se a referida molécula de anticorpo a partir da cultura referida.

9. Um anticorpo que se ligue a P-selectina, não se ligue ao factor complemento C1q e não se ligue a receptores Fc $\gamma$  em células NK, contendo uma parte Fc derivada de uma origem humana, em que o anticorpo possa ser obtido pela célula hospedeira da reivindicação 7.

10. Uma composição que inclua uma molécula de anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 9.

11. A composição da reivindicação 10, que seja uma composição farmacêutica ou para diagnóstico.

12. Uma composição farmacêutica incluindo um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 9 e pelo menos um excipiente aceitável do ponto de vista farmacêutico.

13. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 9 para utilização na profilaxia ou no tratamento de patologias inflamatórias e trombóticas.

14. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 9 para utilização na profilaxia ou no tratamento de consoante a reivindicação 13, em que as patologias referidas sejam a doença oclusiva arterial periférica (PAOD) ou a isquémia de membros crítica (CLI).

15. Um estojo que inclua uma molécula de anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 9, uma molécula de ácido nucleico da reivindicação 5, um vector da reivindicação 6 ou uma célula hospedeira da reivindicação 7.

Lisboa, 5 de Abril de 2013.

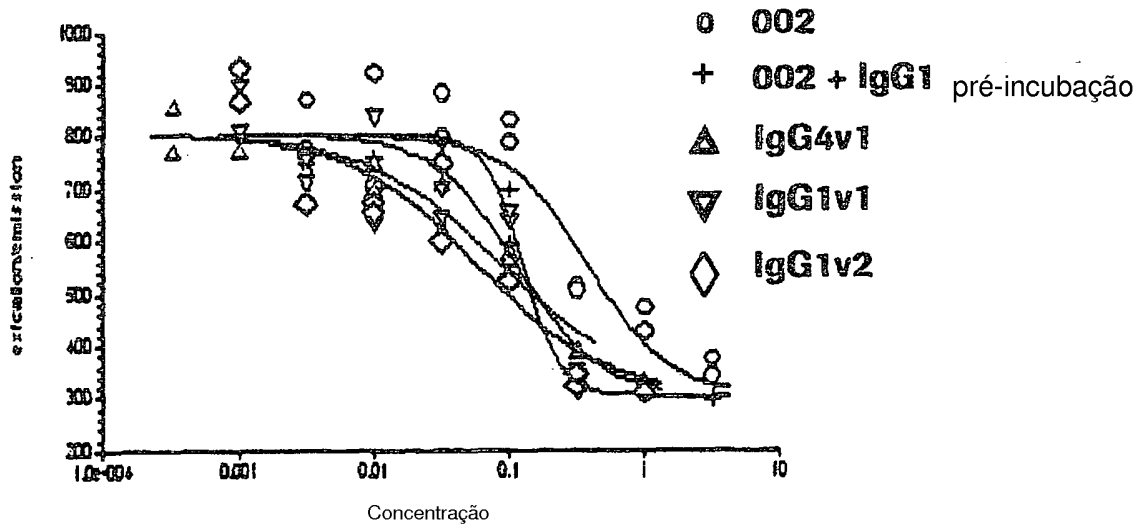


Fig.1

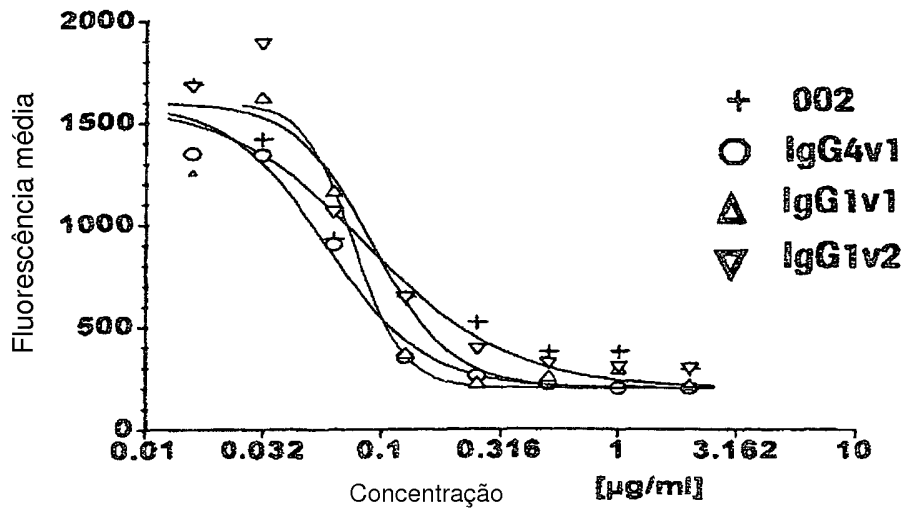


Fig.2

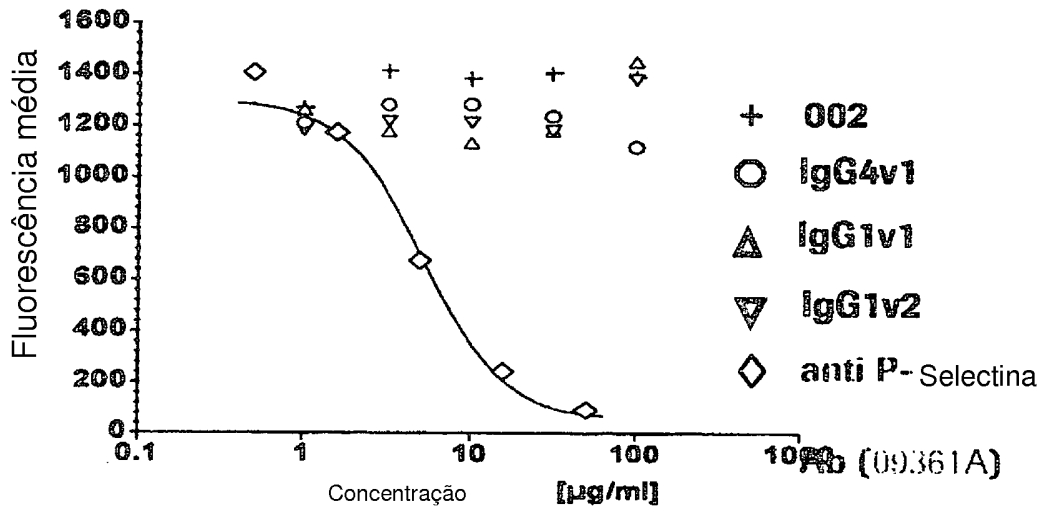


Fig. 3a

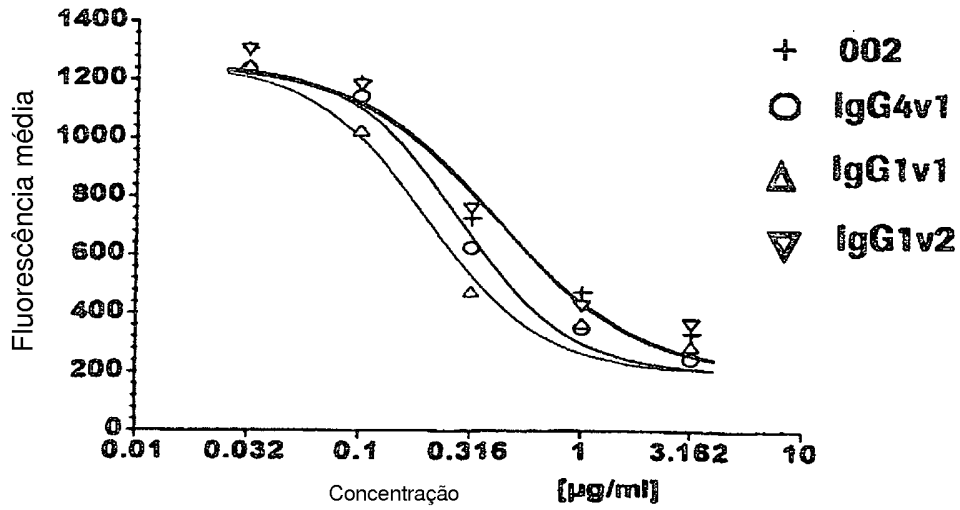


Fig. 3b



P-selectina- CHO

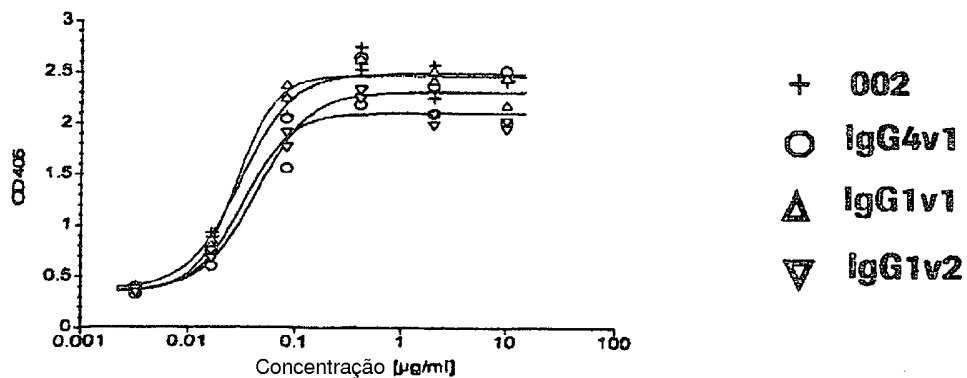


Fig. 4a

E-Selectina -CHO

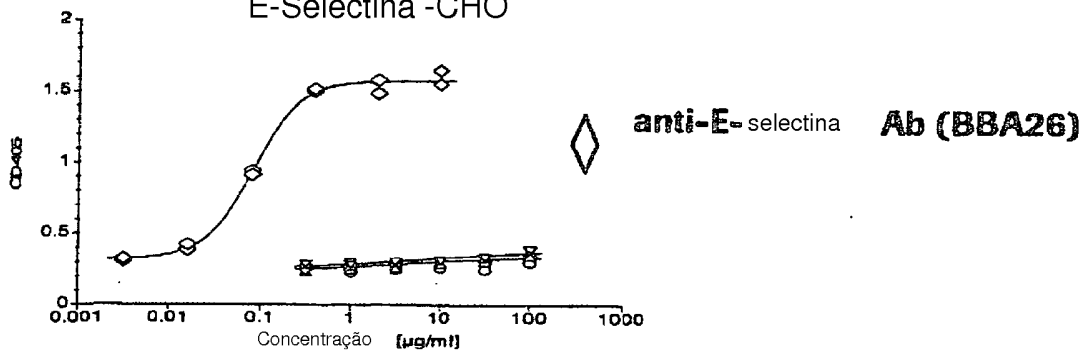


Fig. 4b

L-Selectina -300.19

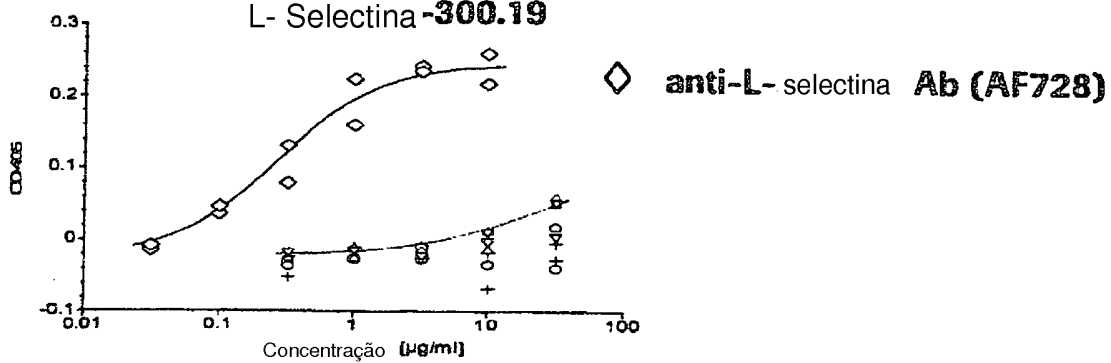


Fig. 4c

Taxa de Corte : 65/s

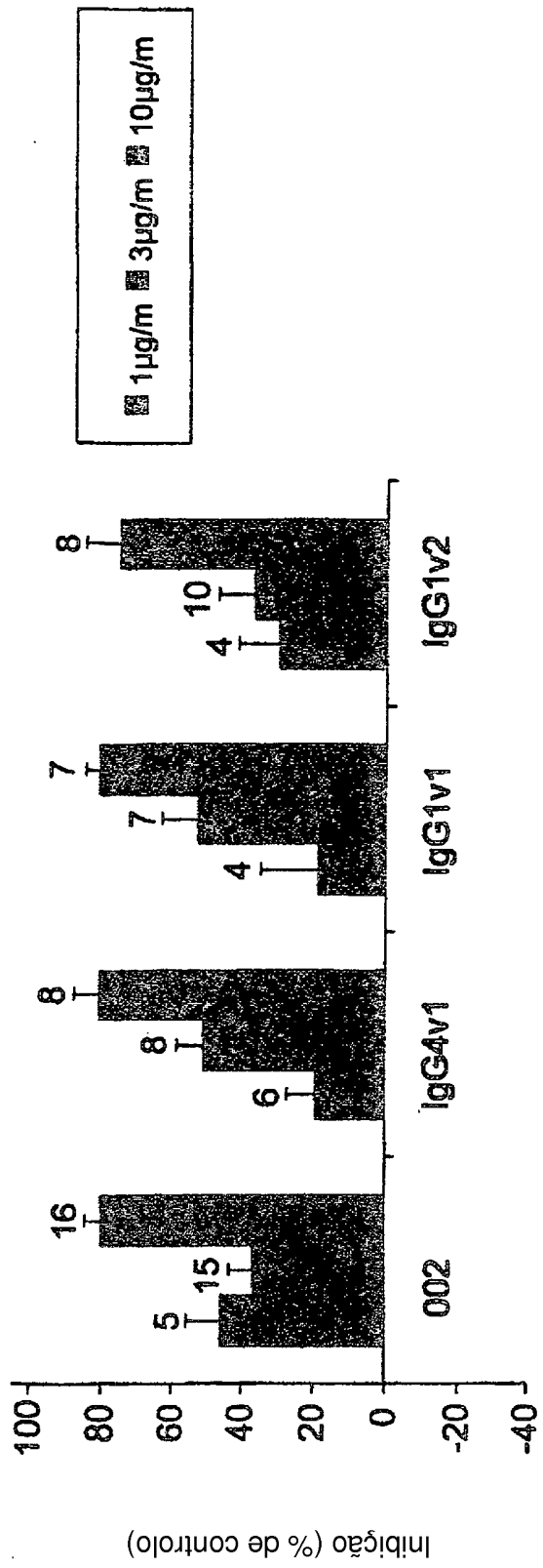


Fig. 5

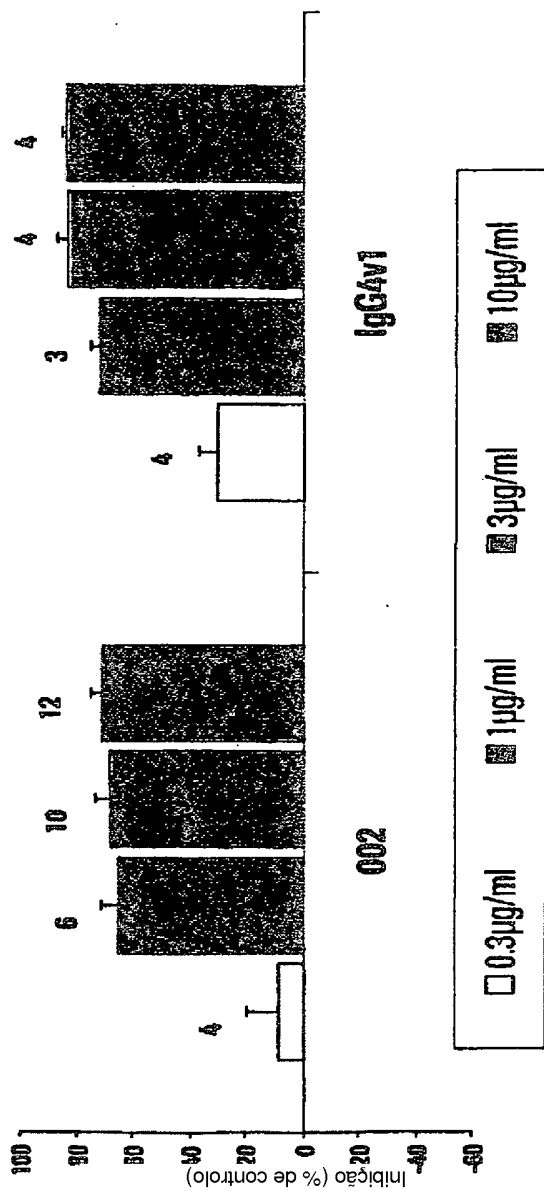


Fig. 6a

Leucócitos aderentes / área padrão

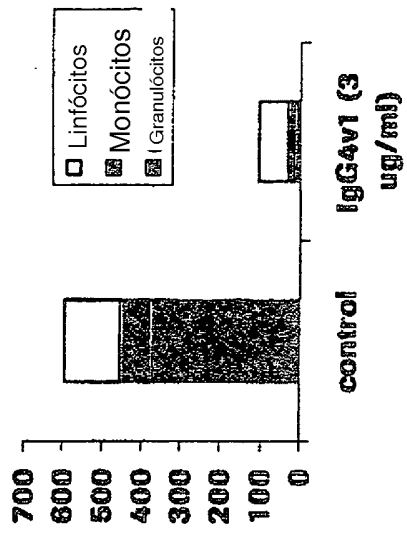


Fig. 6b