

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.03.28	(73) Titular(es): SCANCELL LIMITED
(30) Prioridade(s): 2007.03.28 GB 0706070	DEPARTMENT OF CLINICAL ONCOLOGY CITY
(43) Data de publicação do pedido: 2010.06.09	HOSPITAL HUCKNALL ROAD NOTTINGHAM,
(45) Data e BPI da concessão: 2011.10.19 011/2012	NOTTINGHAMSHIRE NG5 1PB GB
	(72) Inventor(es):
	LINDA GILLIAN DURRANT GB
	RACHAEL LOUISE METHERINGHAM GB
	VICTORIA ANNE PUDNEY GB
	(74) Mandatário:
	MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
	AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM IMUNOGLOBULINAS QUE POSSUEM EPÍTOPOS DE GP100 E TRP2**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UM ÁCIDO NUCLEICO QUE COMPREENDE UM PROMOTOR NÃO ESPECÍFICO E UMA SEQUÊNCIA QUE CODIFICA UM ANTICORPO RECOMBINANTE. A MOLÉCULA DE ANTICORPO TEM EPÍTOPOS DE LINFÓCITOS T HETERÓLOGOS NA MESMA DE MODO QUE O ANTICORPO NÃO PODE TOMAR A SUA CONFORMAÇÃO NATIVA QUANDO O ÁCIDO NUCLEICO É EXPRESSO. OS EPÍTOPOS DE LINFÓCITOS T HETERÓLOGOS SÃO: GTGRAMLGHTHTMEVTYH EM CDRH1 E CDRL3 SVYDFFVWL EM CDRH2, E WNRQLYPEWTEAQRDL EM CDRH3 E CDRL1. A ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO RESULTA NUMA RESPOSTA IMUNE CONTRA OS EPÍTOPOS DE CÉLULAS T.

RESUMO**"ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM IMUNOGLOBULINAS QUE POSSUEM
EPÍTOPOS DE gp100 E TRP2"**

A presente invenção proporciona um ácido nucleico que compreende um promotor não específico e uma sequência que codifica um anticorpo recombinante. A molécula de anticorpo tem epítopos de linfócitos T heterólogos na mesma de modo que o anticorpo não pode tomar a sua conformação nativa quando o ácido nucleico é expresso. Os epítopos de linfócitos T heterólogos são:

GTGRAMLGTHTMEVTVYH em CDRH1 e CDRL3

SVYDEFFVWL em CDRH2, e

WNRQLYPEWTEAQRLD em CDRH3 e CDRL1.

A administração de ácido nucleico resulta numa resposta imune contra os epítopos de células T.

DESCRIÇÃO

"ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM IMUNOGLOBULINAS QUE POSSUEM EPÍTOPOS DE gp100 e TRP2"

A presente invenção refere-se a ácidos nucleicos e a sua utilização como vacinas, aos ácidos nucleicos que codificam epítopos de linfócitos T contra os quais se quer desencadear uma resposta imune. Tais vacinas podem ser utilizadas no tratamento de tumores.

No campo das vacinas contra o cancro e infecções virais crónicas, está-se a tornar evidente que factores diferentes da frequência, tais como a avidéz funcional de células T específicas de tumor e via de sensibilização, são determinantes principais na maximização da eficácia da vacina. Vários grupos mostraram que as células T CD8⁺ de alta avidéz demonstram actividade antitumoral superior (Alexander-Miller, *Immunologic Research*, 2005; 31: 13-24. Hodge *et al*, *J Immunol* 2005; 174: 5994-6004, Valmori *et al*, *J Immunol* 2002; 168: 4231-40, Zeh *et al*, *J Immunol* 1999; 162; 989-94). Foi sugerido que os linfócitos T de alta avidéz desempenham um papel vital na regressão tumoral em pacientes. Isto é exemplificado num estudo em que se detectaram linfócitos que se infiltram em tumores (TIL) específicos de antígenos de alta avidéz num paciente com uma impressionante regressão tumoral (Khong & Rosenberg, *J Immunol* 2002; 168: 951-6). Também estão a aparecer evidências que demonstram que a transferência adoptiva de células T específicas de tumor autólogas estimuladas *in vitro* é bem sucedida, possivelmente porque a estimulação *in vitro* permite a selecção das células T de alta avidéz (Vignard *et al.*, *J Immunol* 2005; 175: 4797-805, Dudley *et al.*, *J Immunother* 2001; 24: 363-73, Morgan *et al*, *J Immunol* 2003; 171: 3287-95, Rosenberg & Dudley, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101 Supl 2: 14639-45).

Até agora vários grupos tentaram induzir uma resposta imune celular contra um epítipo predeterminado utilizando um anticorpo como um portador para esse epítipo. Por exemplo, o documento WO 96/19584 (Bona *et al.*) revela anticorpos quiméricos em que são inseridos epítopos de células T nas regiões determinantes de

complementaridade (CDR) de um anticorpo e alega que tais anticorpos quiméricos são adequados para induzir uma resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL). No entanto, este documento revela que o ADN deve codificar uma proteína funcional. Portanto, no resumo, indica-se que “as capacidades funcionais do epítopo e da imunoglobulina parental são conservadas”. Além disso, na página 21, indica-se “que a inserção do epítopo desejado deveria ser numa região do ácido nucleico que codifica a molécula de imunoglobulina parental que não seja essencial para a expressão ou função da molécula de imunoglobulina parental”. Além disso, todos os exemplos no documento WO 96/19584 mostram que é produzida imunoglobulina intacta após a inserção do epítopo de linfócitos T.

A Patente dos Estados Unidos N° 7.067.110 revela um método para induzir uma resposta imune contra um antigénio utilizando uma proteína de fusão de anticorpo que não possui um domínio de região variável de imunoglobulina fusionado com o antigénio por uma ligação polipeptídica. A proteína de fusão conserva a capacidade de se ligar a Fc.

O documento EP0759944 revela um procedimento para incorporar epítomos de células T dentro de uma molécula de anticorpo que é secretada como uma proteína de imunoglobulina intacta e que pode direccionar epítomos de CTL para tumores para torná-los melhores alvos para CTL.

O documento WO 00/64488 revela que uma resposta de CTL pode ser induzida por um ácido nucleico que codifica um anticorpo quimérico que tem epítomos de linfócitos T heterólogos inseridos nas CDR mas não na região variável dos mesmos, contanto que o ácido nucleico se destine a expressão em linfócitos B. Já que os linfócitos B não podem estimular respostas de linfócitos T naïve, a vacina descrita no documento WO 00/64488 seria útil somente no reforço de respostas de linfócitos T preexistentes.

O documento WO 02/092126 revela que uma resposta de CTL pode ser induzida por um polipéptido que compreende um epítopo de linfócitos T heterólogos e a parte de Fc humano que se liga ao receptor CD64 de alta afinidade. No entanto, os presentes inventores mostraram agora que a disrupção da sequência de anticorpo pela inserção de um epítopo de linfócitos T, por exemplo, dentro de uma CDR inapropriada ou inclusive dentro da

região variável de um anticorpo, evita a associação de cadeia pesada e leve e não é secretado anticorpo funcional. O ADN que codifica estes anticorpos com enrolamento incorrecto gera de forma inesperada respostas de linfócitos T fortes. Além disso, isto não é mediado por meio de CD64 já que IgG2 humana, que não se une a CD64 de ratinho ou humano, funciona tão eficazmente como IgG1 humana.

Num aspecto da presente invenção é proporcionado um ácido nucleico que compreende um promotor não específico e uma sequência que codifica um anticorpo recombinante, em que a molécula de anticorpo tem epítomos de linfócitos T heterólogos de modo que o anticorpo não pode tomar a sua conformação nativa quando o ácido nucleico é expresso, sendo os epítomos de linfócitos T heterólogos:

GTGRAMLGTHTMEVTVYH em CDRH1 e CDRL3

SVYDFFVWL em CDRH2, e

WNRQLYPEWTEAQRLD em CDRH3 e CDRL1.

Sem desejar estar vinculado pela teoria, a presente invenção baseia-se, pelo menos em parte, no conceito de que uma resposta a linfócitos T contra um epítomo de linfócitos T específicos (tal como um epítomo de CTL), pode ser gerada por meio da administração de um ácido nucleico que codifica um polipéptido que inclui o epítomo de linfócitos T mas não epítomos de linfócitos T reguladores. Acredita-se que o ácido nucleico é captado por células apresentadoras de antígenos (APC), migra para os gânglios linfáticos e é apresentado directamente ou é expresso para produzir um polipéptido que é secretado e que é captado depois por outras APC. O primeiro ácido nucleico mencionado é adequado para estimular epítomos de linfócitos T auxiliares e o segundo é adequado para estimular respostas de CTL. O polipéptido que é codificado pelo ácido nucleico idealmente não tem nenhum epítomo de linfócitos T naturais. Os polipéptidos adequados com respeito a isso são moléculas imunes, tais como anticorpos. São adequadas para a prática da presente invenção cadeias pesadas e leves de anticorpos que não se podem associar de modo que a cadeia leve permanece nas APC e de modo que a cadeia pesada é secretada.

Foi identificada uma população de linfócitos T supressores aproximadamente há 40 anos, mas o progresso foi dificultado pela

falta de técnicas específicas para identificar as células e devido ao cepticismo científico com respeito à existência de supressão. No entanto, Sakaguchi *et al.* ressuscitou o interesse nas células supressoras em 1995 demonstrando que a transferência de linfócitos com depleção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em ratinhos atímicos provocou o desenvolvimento de diversas doenças autoimunes nos ratinhos receptores e que a reconstituição com linfócitos T CD4⁺CD25⁺ evitou reacções autoimunes nestes ratinhos (Sakaguchi *et al* J. Immunol 1995; 155: 1151-1164). Posteriormente, numerosos estudos em ratinhos e seres humanos mostraram que diversas populações de linfócitos T com actividade reguladora desempenham um papel importante na supressão de respostas imunes (tanto inatas como adaptativas) a antigénios próprios - *self* - (controlando a tolerância ao *self*) (Sakaguchi *et al* J Immunol 1995; 155: 1151-1184) assim como exógenos (Shevach, Immunity 2006; 25: 195-201, Coleman *et al*, J. Cell Mot. Med 2007; 11: 1291-1325). Foi mostrado que a depleção de linfócitos Treg em modelos de ratinho de cancro melhora a rejeição de tumores mediada por resposta imune endógena (Shimizu, *et al*, J. Immunol. 1999; 163: 5211-5218, Onizuka *et al*, Cancer Research 1999; 59: 3128-3133) e a imunidade antitumoral específica de antigénios (Tanaka, *et al*, J. Immunother. 2002; 25: 207-217). Além disso, a depleção de linfócitos Treg aumenta a imunoterapia tumoral incluindo vacinação (Tanalca, *et al*, J. Immunother. 2002; 25: 207-217, Dannull *et al*, J. Clin. Invest. 2005; 115: 3623-3633) e bloqueio de CTLA-4 (Sutmuller *et al*, J. Exp. Med. 2001; 194: 823-832). Além disso, são aumentados os números de linfócitos Treg no sangue periférico (Woo *et al*, Cancer Research 2001; 61: 4766-4772, Curiel *et al*, Nature Medicine 2004; 10: 942-949, Wolf *et al*. Clin. Cancer Research 2003; 9: 606-612. Sasada *et al*, Cancer 2003; 98: 1089-1099) e populam o microambiente tumoral e drenam os gânglios linfáticos (Curiel *et al*, Nature Medicine 2004; 10: 942-949, Sasacia *et al*, Cancer 2003; 98: 1089-1099, Liyanage *et al*, J. Immunology 2002; 169: 2756-2761, Matsuura *et al*, Cancer 2006; 106: 1227-1236. Yang *et al*, Blood 2006; 107: 3639-3646, Alvaro *et al*, Clin. Cancer Research 2005; 11: 1467-1473) de pacientes com diferentes cancros. Em pacientes com carcinoma gástrico (Sasada *et al*, Cancer 2003; 98: 1089-1099, Ichihara *et al*, Clinical Cancer Research 2003; 9; 4404-4408) e

cancro de ovário (Curiel *et al*, Nature Medicine 2004; 10: 942-949) foram associados prognóstico negativo e taxas de sobrevivência reduzidas com maiores frequências de linfócitos Treg. Também foi mostrado que os linfócitos Treg suprimem/inibem a proliferação, produção de citocinas (IFN γ , IL-2) e actividade citolítica de linfócitos T CD8⁺ (Liyanage *et al*, J. Immunology 2002; 169: 2756-2761, Piccirillo *et al*. J. Immunology 2001; 167: 1137-1140, Mempel *et al*, Immunity 2006; 25: 129-141, Annacker *et al*, J. Immunology 2001; 166: 3008-3018, Woo *et al*, J. Immunology 2002; 168: 4272-4276) e CD4⁺ (Liyanage *et al*, J. Immunology 2002, 169: 2756-2761, Ichihara *et al*, Clinical Cancer Research 2003; 9: 4404-4408, Nishikawa *et al*, Blood 2005; 106,008-1011) específicos de tumor. Além disso, os linfócitos Treg podem suprimir as funções das células dendríticas (Romagnani *et al*, Eur. J. Immunol. 2005; 35: 2452-2458), linfócitos NK (Ralainirina *et al*, J. Loukoc Biol. 2007; 81: 144-153) e linfócitos B (Lim *et al*, J. Immunology 2005; 175: 4180-4183). Tomados juntos, estes estudos sugerem um papel importante dos linfócitos Treg na imunopatologia tumoral e indicam uma correlação próxima entre as frequências de linfócitos Treg e o crescimento tumoral.

Os linfócitos Treg são divididos em linfócitos T CD4⁺CD25⁺ naturais e diversas populações de linfócitos Treg induzidos/adaptativos (Shevach, Immunity 2006; 25: 196-201, Bluestone *et al*, Nat. Immunol. 2005; 6: 345-352) (Quadro 1). Aproximadamente 5 %-10 % dos linfócitos T CD4⁺ em ratinhos e seres humanos são linfócitos Treg naturais (Sakaguchi *et al*, Nat. Immunology 2005; 6: 345-352). Os linfócitos Treg naturais desenvolvem-se no timo por interacção de TCR forte com péptido próprio (Picca *et al*, Current Opinion in Immunafogy 2005; 17: 131-136, Jordan *et al*, Nature Immunology 2001; 2(4): 301-306, Picca *et al*, Immunological Reviews 2006; 212: 74-85), enquanto que os linfócitos Treg induzidos desenvolvem-se a partir de linfócitos T não reguladores na periferia. Esta conversão extratímica requer condições imunológicas especiais tais como exposição contínua a baixa dose de antigénio, exposição a um antigénio periférico sistémico ou exposição a TGF β (Shevach. Immunity 2006; 25: 195-201, Akbar *et al*, Nat. Rev. Immunol. 2007; 7: 231-237). Os linfócitos Treg podem mediar sua supressão por um ou uma combinação dos

seguintes mecanismos: i) mecanismo dependente de contacto célula-célula, ii) através da secreção de citocinas imunossupressoras como IL-10 ou TGF β ou iii) morte directa de células alvo pela via de perforina-grancima (von Boehmer, *Nature Immunology* 2005; 6(4): 338-344).

Até hoje, sabe-se muito pouco sobre a especificidade de antígeno dos linfócitos Treg humanos. Wang *et al.* notificaram a identificação de clones de linfócitos Treg funcionais CD4⁺CD25⁺GITR⁺ específicos de LAGE-1 em pacientes com cancro (Wang *et al.*, *Immunity* 2004; 20: 107-118). Vence *et al.* demonstraram a presença de linfócitos Treg CD4⁺ específicos de antígeno tumoral no sangue periférico de pacientes com melanoma metastático (Vence *et al.*, *PNAS* 2007; 104(52): 20884-20889). Estes linfócitos Treg reconheceram uma ampla série de antígenos tumorais, incluindo TRP1, NY-ESO-1, gp100 e survivina. Além disso, Vence *et al.* foram os primeiros em demonstrar a presença de epítomos de linfócitos Treg específicos de NY-ESO-1 dentro da molécula de NY-ESO-1. Além disso, mostrou-se que a vacinação de pacientes com melanoma com células dendríticas carregadas com péptidos sintéticos ou lisados tumorais induzia o aumento das frequências de linfócitos Treg, juntamente com a expansão de linfócitos T CD8⁺ específicos de tumores (Chakraborty *et al.*, *Hum. Immunology* 2004; 65: 794-802). Isto sugere a possibilidade de que a vacina continha epítomos de linfócitos Treg não identificados assim como epítomos de linfócitos T CD8⁺, que levam à expansão de linfócitos Treg *in vivo* por activação específica de ligando através do receptor de linfócitos T de linfócitos Treg (TCR). É amplamente aceite que os linfócitos Treg requerem activação específica de antígenos através de união/reconhecimento de TCR mas mediam na supressão de testemunha não específica de antígeno (Thorton & Shevach, *J. Immunology* 2000; 164: 1831-190). Além disso, Li *et al.* sugeriram a existência de epítomos de Treg dominantes dentro da proteína do núcleo do Vírus da Hepatite C que estimulavam os linfócitos Treg específicos de VHC em pacientes infectados (Li *et al.*, *Immunol. Cell Biol.* 2007; 85(3): 197-204). Colectivamente, estes estudos além do achado recente de que a imunização de ratinhos transgénicos HHD com a construção de ADN antiendotelial C200Fc, não estimulava uma resposta imune antitumoral específica de Tie-2₁-

significativa e o aumento da frequência de células secretoras de IFN γ específicas de Tie-2₁₋₁₉₈ de esplenócitos de ratinhos HHD depois da eliminação de linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺ (por administração de 400 μ g de anticorpo monoclonal PC61) antes de imunização com ADN de C200Fc (Middleton, Tese de Doutorado. Universidade de Nottingham, Novembro de 2007) indicam que o Tie-2₁₋₁₉₆ dentro da vacina de ADN contém epítomos de linfócitos Treg não identificados assim como o epítopo CD8⁺. Isto explicaria o fracasso da vacina para romper a tolerância com o antigénio próprio Tie-2 e para induzir imunidade antitumoral em ratinhos HHD devido a linfócitos Treg expandidos específicos de antigénio abundantes que suprimem a resposta imune antitumoral mediada por células. Existe, portanto, uma vantagem em expressar epítomos efectores de T com portadores imunes inertes que não expressam epítomos de Treg para dirigir a resposta imune ao epítopo effector e evitar estimulação da resposta de Treg dominante.

Vantajosamente, o ácido nucleico da presente invenção inclui uma sequência que codifica uma sequência, tal como uma sequência líder, que permite que o polinucleótido expresso, e especificamente a cadeia pesada do anticorpo recombinante, seja secretado. Isto permite que o polinucleótido seja transferido a células apresentadoras de antigénios (APC). A sequência poderia ser uma sequência líder que se expressa de forma natural com o polinucleótido ou poderia ser uma sequência líder heteróloga, tal como uma sequência líder de imunoglobulina, que é adicionada.

A estrutura de uma cadeia pesada de anticorpo é conhecida pelos pertios na especialidade e geralmente inclui regiões variáveis e constantes. O anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal e pode ser IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM, embora seja preferido IgG. O anticorpo de IgG pode ser qualquer subclasse de IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana ou IgG1, IgG2a, IgG2b ou IgG3 de ratinho. O anticorpo de IgG pode ser um anticorpo de IgG1 humana que tem o domínio de união Fc de IgG2 ou um anticorpo de IgG2 humana que tem o domínio de união de Fc de IgG1. A cadeia pesada pode ter a região constante de um anticorpo humano e a região variável ou hipervariável (CDR) de um anticorpo monoclonal de ratinho em que foram inseridos epítomos de linfócitos T heterólogos. A região variável distinta da região

hipervariável também pode ser derivada da região variável de um anticorpo humano. Quando se aplica a anticorpos (isto é, que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve), é dito que o anticorpo é humanizado. Conhecem-se na técnica métodos para preparar anticorpos humanizados. São descritos métodos, por exemplo, em Winter, Patente de Estados Unidos Nº 5.225.539. A região variável da cadeia pesada fora da região hipervariável de ratinho também pode ser de um anticorpo monoclonal de ratinho. Em tal caso, a região variável completa deriva de anticorpo monoclonal murino e, quando se aplica a anticorpos, diz-se que o anticorpo está quimerizado. Conhecem-se na técnica métodos para preparar anticorpos quimerizados. Tais procedimentos incluem, por exemplo, os descritos nas Patentes de Estados Unidos de Boss (Celltech) e de Cabilly (Genentech). Veja-se também Patente de Estados Unidos Nº 4.816.397 e 4.816.567, respectivamente.

Pode ser proporcionado um ácido nucleico separado que codifica a cadeia leve do anticorpo. O epítipo de linfócitos T pode ser tal que a cadeia leve não toma sua conformação nativa quando se expressa o ácido nucleico. A cadeia leve pode ter qualquer das características descritas no presente documento com respeito à cadeia pesada. O anticorpo da invenção pode ter a sequência da Figura 60.

A invenção também proporciona:

- uma vacina que compreende um ácido nucleico da invenção e um adjuvante;
- uma composição farmacêutica que compreende um ácido nucleico da invenção e um portador, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável;
- um ácido nucleico da invenção para utilização em medicina;
- a utilização de um ácido nucleico tal da invenção no fabrico de um medicamento para estimular uma resposta imune contra pelo menos um dos epítopos de linfócitos T; e
- um ácido nucleico da invenção para utilização na estimulação de uma resposta imune contra pelo menos um dos epítopos de linfócitos T.

Surpreendentemente, os presentes inventores descobriram que anticorpos, tais como anticorpos monoclonais, que podem ser humanos ou não humanos, que têm epítopos de linfócitos T

predeterminados clonados dentro de suas regiões variáveis, de modo que se rompa a estrutura de anticorpo primária, inibem o dobramento e/ou limitam a secreção a somente cadeia pesada ou quantidades muito baixas de anticorpo intacto, estimulam respostas de linfócitos T específicos de antígeno e auxiliares fortes. Os inventores também descobriram que este efeito pode ser conseguido utilizando ácido nucleico que codifica a cadeia pesada de um anticorpo. Acredita-se que o epítipo de linfócitos T seja processado mas não seja destruído pelo imunoproteossoma. Em certas formas de realização, a invenção proporciona uma vacina de ADN que apresenta epítopos de linfócitos T predefinidos dentro de imunoglobulina desnaturada que potencia a frequência e a avides da resposta de linfócitos T. Os polipéptidos codificados pelos ácidos nucleicos da invenção podem ser denominados no presente documento "immunobodies".

O achado de que pode ser estimulada uma resposta imune contra um epítipo de linfócitos T por um ácido nucleico que codifica pelo menos a cadeia pesada de uma cadeia de imunoglobulina em que foi inserido o epítipo de linfócitos T de modo que uma molécula de imunoglobulina não pode tomar sua conformação nativa é contrário às expectativas da técnica, em que é ensinado que o anticorpo deve ser expressa numa forma funcional. Por exemplo, como foi analisado anteriormente o documento WO 96/19584 ensina que, quando um ácido nucleico codifica um anticorpo em que são inseridos epítopos de linfócitos T nas CDR do anticorpo, o ácido nucleico deve codificar um anticorpo funcional. De forma similar, o documento EP0759944 descreve um procedimento para incorporar epítopos de linfócitos T dentro de uma molécula de anticorpo que é secretado como uma proteína de imunoglobulina intacta. Embora a patente de Estados Unidos nº 7.067.110 revela que pode ser induzida uma resposta imune contra um antígeno por uma proteína de fusão de anticorpo e o antígeno, o anticorpo é revelado que não possui uma região variável de imunoglobulina. Além disso, esta proteína de fusão terá epítopos de linfócitos T reguladores no antígeno. Portanto, embora a proteína pode estimular uma resposta imune, não estimulará respostas de linfócitos T de alta avides devido a epítopos de linfócitos T reguladores no antígeno.

Como foi analisado anteriormente, o documento WO 00/64488 revela um ácido nucleico que codifica um anticorpo quimérico que tem epítomos de linfócitos T heterólogos inseridos nas CDR mas não a região variável dos mesmos, o dito ácido nucleico sendo dirigido para expressão em linfócitos B. O ácido nucleico da presente invenção não é dirigido para a expressão em linfócitos B e, portanto, não será dirigida a linfócitos B especificamente *in vitro* ou *in vivo*. O ácido nucleico da presente invenção pode ser captado por qualquer célula apresentadora de antigénio, incluindo células dendríticas, e, portanto, pode sensibilizar respostas de linfócitos T auxiliares e CTL naïve, enquanto que a vacina descrita no documento WO 00/64488 somente seria útil no reforço de respostas de linfócitos T preexistentes.

A análise da avidéz funcional de respostas induzidas por ácidos nucleicos de acordo com a invenção demonstrou que pode ser gerada uma resposta de alta avidéz em comparação com imunização com péptido sintético. Isto está correlacionado também com uma capacidade potenciada de reconhecer e matar células tumorais *in vitro* e *in vivo*. Esta observação é comparável com a documentada em outros estudos em que a actividade antitumoral é melhor mostrada por CTL específicos de TRP2 de alta avidéz (Zeh *et al*, J Immunol 1999; 162: 989-94, Harada *et al*, Immunology 2001; 104: 67-74).

Os ácidos nucleicos da presente invenção têm um promotor não específico; isto é, um promotor que promoverá a expressão do ácido nucleico mas que não tem especificidade para células em que é promovida a expressão. O promotor provoca preferivelmente expressão do ácido nucleico em células dendríticas e/ou queratinócitos. Os exemplos de promotores adequados incluem o promotor de CMV, o promotor de SV40 e outros promotores não específicos conhecidos pelos peritos na especialidade.

O ácido nucleico de certos aspectos da invenção codifica um anticorpo que inclui todos os elementos principais de um anticorpo, isto é cadeias pesadas e leves que incluem regiões variáveis e constantes. O anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal e pode ser IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM, embora seja preferido IgG. O anticorpo de IgG pode ser de qualquer subclasse de IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana ou IgG1, IgG2a, IgG2b ou IgG3 de ratinho. O anticorpo de IgG pode ser um anticorpo

de IgG1 humana que tem o domínio de união a Fc de IgG2. O anticorpo pode ter a região constante de um anticorpo humano e a região variável ou hipervariável de um anticorpo monoclonal de ratinho em que foram inseridos epítomos de linfócitos T heterólogos. A região variável distinta da região hipervariável também pode derivar da região variável de um anticorpo humano. Um anticorpo tal é dito que é humanizado. Conhecem-se na técnica procedimentos para preparar anticorpos humanizados. Os procedimentos são descritos, por exemplo, em Winter, Patente de Estados Unidos N° 5.225.539. A região variável do anticorpo fora da região hipervariável de ratinho também pode derivar de um anticorpo monoclonal de ratinho. Em tal caso, a região variável completa deriva de anticorpo monoclonal murino e é dito que o anticorpo está quimerizado. Conhecem-se na técnica métodos para preparar anticorpos quimerizados. Tais procedimentos incluem, por exemplo, os descritos nas patentes de Estados Unidos de Boss (Celltech) e de Cabilly (Genentech). Vejam-se também Patentes de Estados Unidos N° 4.816.397 e 4.816.567, respectivamente.

O ácido nucleico de certos aspectos da invenção é tal que a cadeia pesada, cadeia leve ou molécula de imunoglobulina expressa do mesmo tem pelo menos um epítomo de linfócitos T heterólogo no mesmo de modo que a cadeia pesada, cadeia leve ou anticorpo completo não possa tomar sua conformação nativa. O epítomo de linfócitos T pode interromper a proteína expressa de modo que a cadeia pesada ou o anticorpo já não podem unir-se a seu antigénio, de modo que as cadeias pesadas e leves já não se podem associar ou de modo que a cadeia pesada ou o anticorpo não possam ser secretadas de forma apropriada, por exemplo. A interrupção pode ser na estrutura terciária do anticorpo que pode evitar a formação das ligações dissulfureto.

Como é analisado em mais detalhe posteriormente, os epítomos de linfócitos T são inseridos em ou substituídos pelas regiões CDR1 e CDR2 do anticorpo. CDR1 e CDR2 formam parte da conformação em lâmina β do anticorpo e estão submersas parcialmente dentro da molécula dobrada. Qualquer mudança em seu comprimento, composição de aminoácidos ou carga romperá esta estrutura e evitará o dobramento e associação das cadeias pesadas e leves. CDRH3 são expostas na superfície da molécula de imunoglobulina e é,

portanto, mais permissiva para alterações. Em certas formas de realização a perda de regiões flanqueantes nos pontos de união de CDRH rompe completamente o dobramento do anticorpo, mas, não obstante, a inserção dos epítomos nestas regiões proporciona boas respostas de linfócitos T. A incorporação de qualquer epítomo dentro da CDRH1 (5 aminoácidos de comprimento) ou CDRH2 (17 aminoácidos de comprimento) provoca suficiente interrupção para permitir a secreção de cadeia pesada, mas somente quantidades muito pequenas de anticorpo intacto, inclusive se a cadeia leve tem sua sequência nativa. Isto mostra que a estrutura secundária é importante para emparelhamento de cadeias pesadas e leves. A incorporação de qualquer epítomo dentro de CDRL1 da cadeia leve dá como resultado um baixo nível de secreção da cadeia leve, inclusive se somente existe um epítomo simples incorporado na CDRH3 da cadeia pesada.

Pretende-se que "epítomo de linfócitos T heterólogo" signifique um epítomo de linfócitos T que é heterólogo para o anticorpo. Por exemplo, um epítomo de linfócitos T heterólogo pode ser um que não estava previamente presente no anticorpo. O epítomo de linfócitos T heterólogo pode ser inserido completo, embora possa ser composto de uma sequência de aminoácidos inserida, juntamente com aminoácidos flanqueantes da segunda parte. Isto é para assegurar que o epítomo inserido tem um perfil de processamento similar no ácido nucleico heterólogo ao do antígeno original.

Surpreendentemente os inventores descobriram que, quando são inseridos epítomos de linfócitos T em regiões CDR ou não CDR estruturalmente confinadas da cadeia pesada, proporcionam respostas de CTL superiores. Isto parece ser devido à secreção de grandes quantidades de cadeia pesada, que somente podem ser associadas debilmente com cadeia leve devido à inserção de epítomos volumosos em suas regiões variáveis. Isto é contrário ao dogma, que indica "que somente as proteínas utilizadas de forma endógena por células apresentadoras de antígenos apresentam-se em moléculas de MHC de classe I e são reconhecidas por CTL", documento WO 96/19584. A captação de antígeno exógeno e apresentação em MHC de classe I é um processo conhecido como apresentação cruzada e habitualmente requer captação por meio de

receptores específicos. Este poderia ser o receptor de CD64 para anticorpos Fc γ 1 humanos. No entanto, seria previsível que grandes quantidades de anticorpo intacto ou complexos de antígeno-anticorpo seriam melhores na direcção a este receptor. Pelo contrário, os resultados apresentados no presente documento claramente mostram que níveis muito baixos de anticorpo intacto e grandes quantidades de cadeia pesada livre, que não se deveriam ligar a CD64, proporcionam respostas de CTL superiores. De facto, mostram-se no presente documento que as respostas de CTL podem ser estimuladas quando são inseridos epítomos de CTL em anticorpos que não se podem unir a CD64, tais como anticorpos IgG2 ou moléculas IgG1 com sua região de ligação a CD64 substituída com a região que não se liga a CD64 de IgG2.

O ácido nucleico que codifica a cadeia pesada preferivelmente inclui uma sequência líder para permitir que seja secretado. Os presentes inventores descobriram que, se a sequência líder da cadeia pesada é retirada para evitar a secreção e permitir que seja produzida mais proteína endógena, isto reduz a resposta de CTL. Isto é completamente contrário às expectativas. Sem desejar estar vinculado à teoria, os inventores acreditam que isto implica que o ácido nucleico expressa-se em células não apresentadoras de antígenos, que secretam altos níveis de cadeia pesada e baixos níveis de proteína nativa que podem depois ser captadas por células apresentadoras de antígenos. Como alternativa, o ácido nucleico pode transfectar directamente as células apresentadoras de antígenos que migram ao gânglio linfático de drenagem em que secretam baixas quantidades de proteína nativa e grandes quantidades de cadeia pesada que é captado pelas mesmas ou células apresentadoras de antígenos adjacentes e apresentam-se em MHC de classe I a CTL naive. Portanto, para que uma vacina de ácido nucleico estimule respostas de CTL eficazes, deve codificar preferivelmente epítomos de CTL dentro de uma proteína que é secretada a níveis muito baixos e/ou ao mesmo tempo secreta grandes quantidades de proteína desnaturada. No entanto, uma resposta de CTL não pode maturar a uma resposta de memória descritiva de alta afinidade na ausência de respostas auxiliares. Portanto, prefere-se se forem inseridos epítomos auxiliares T na cadeia pesada ou a molécula de imunoglobulina, preferivelmente na

Região variável da cadeias leves de anticorpo. De novo, surpreendentemente e ao contrário do dogma que indica que “somente as proteínas captadas de forma exógena pelas células alvo apresentam-se por moléculas do MHC de classe II e são reconhecidas por linfócitos T auxiliares”, a cadeia leve foi secretada somente em quantidades muito baixas. A retirada da sequência livre para evitar a secreção da cadeia leve não teve efeito nas respostas auxiliares. Consequentemente, o ácido nucleico da presente invenção pode ou não ter uma sequência líder para a cadeia leve do anticorpo. Estes resultados implicam que o ácido nucleico é captado pelas células apresentadoras de antígenos que apresentam os epítomos de linfócitos T no contexto de MHC de classe II de proteína sintetizada de forma endógena, possivelmente por autofagia. Para que os linfócitos T auxiliares auxiliem às respostas de CTL, ambos os epítomos de linfócitos T que reconhecem devem ser apresentados nas mesmas células apresentadoras de antígenos num processo conhecido como ajuda de linfócitos T ligados. Isto implica que a célula apresentadora de antígenos que sintetiza a cadeia leve, codificada pelo ácido nucleico, também deve sintetizar, secretar e apresentar de forma cruzada os epítomos de CTL por si mesmas ou captar a cadeia pesada de uma APC adjacente.

São revelados no presente documento células dendríticas isoladas que apresentam os epítomos de linfócitos T auxiliares heterólogos em MHC de classe II de cadeia leve produzida de forma endógena e epítomos de CTL heterólogos de cadeia pesada apresentada de forma cruzada. Tais células dendríticas podem ser utilizadas nas terapias descritas no presente documento.

Os ácidos nucleicos da presente invenção podem tornar os epítomos de linfócitos T existentes mais imunogênicos codificando um anticorpo desnaturalizado que leva a um aumento em tanto a frequência como a avidéz de respostas de linfócitos T.

O ácido nucleico da invenção pode ser ADN, ADNc ou ARN tal como ARNm, obtido por clonagem ou produzido completamente ou parcialmente por síntese química. Para utilização terapêutica, o ácido nucleico está preferivelmente numa forma capaz de ser expressa no sujeito a tratar.

O ácido nucleico da presente invenção pode ser recombinante ou ser proporcionado como um isolado, em forma isolada e/ou purificada. Pode estar sem ou substancialmente sem ácido nucleico que flanqueie o gene no genoma humano, excepto possivelmente uma ou mais sequências reguladoras para a expressão. Quando o ácido nucleico de acordo com a invenção inclui ARN, a referência às sequências mostradas no presente documento deveria ser interpretada como referência ao ARN equivalente, com T substituída por U.

Os ácidos nucleicos da presente invenção podem ser preparados facilmente pelo perito na especialidade, por exemplo, utilizando a informação e referências contidas no presente documento e técnicas conhecidas na matéria (por exemplo, veja-se Sambrook, Fritsch e Maniatis, "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. e Ausubel *et al*, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley e Sons, 1992), dadas as sequências de ácido nucleico e clones disponíveis. Estas técnicas incluem (i) a utilização da reacção em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar amostras de dito ácido nucleico, por exemplo, de fontes genómicas, (ii) síntese química ou (iii) preparar sequências de ADNc. O ADN que codifica o polipéptido pode ser gerado e utilizado de qualquer maneira adequada conhecida pelos peritos na especialidade, incluindo tomando ADN codificante, identificando locais de reconhecimento de enzimas de restrição adequados a qualquer dos lados da parte a expressar e cortando a dita parte do ADN. Outra abordagem recombinante consiste em amplificar a parte relevante do ADN com iniciadores de PCR adequados. Podem ser realizadas modificações às sequências, por exemplo, utilizando mutagénese dirigida, para levar à expressão de péptido modificado ou para levar em consideração preferências a nível dos codões nas células hospedeiras utilizadas para expressar o ácido nucleico.

Com a finalidade de obter a expressão das sequências de ácido nucleico, as sequências podem ser incorporadas num vector que tenha uma ou mais sequências de controlo unidas operativamente ao ácido nucleico para controlar sua expressão. Os vectores podem incluir outras sequências tais como promotores ou potenciadores para regular a expressão do ácido nucleico inserido, sequências de ácido nucleico de modo que o polipéptido seja produzido como uma

fusão e/ou ácido nucleico que codifica sinais de secreção de modo que o polipéptido produzido na célula hospedeira seja secretado da célula. Se for desejado, pode ser obtido depois o polipéptido transformando os vectores em células hospedeiras em que o vector é funcional, cultivando as células hospedeiras de modo que o polipéptido seja produzido e recuperando o polipéptido das células hospedeiras ou do meio circundante. São utilizadas células procariotas e eucariotas para esta finalidade na técnica, incluindo estirpes de *E. coli*, levedura e células eucariotas tais como células de insecto e células animais, por exemplo, células COS, CHO, Melanoma de Bowes e outras células humanas adequadas. Quando a presente invenção se refere a ácido ou ácidos nucleicos que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo, os ácidos nucleicos respectivos podem estar presentes no mesmo vector de expressão, dirigidos pelos mesmos ou diferentes promotores ou vectores de expressão separados.

Os ácidos nucleicos da presente invenção podem ser utilizados para estimular uma resposta imune contra pelo menos um dos epítomos de linfócitos T num paciente tal como um mamífero, incluindo ser humano. As respostas de linfócitos T auxiliares e/ou citotóxicos podem ser estimuladas. A resposta de linfócitos T contra um epítomo particular obtido pela presente invenção pode ter uma maior avidéz que a obtida por imunização com o mesmo epítomo como um péptido simples ou por imunização com o mesmo epítomo codificado dentro de um antigénio como um péptido ou um ácido nucleico. Os ácidos nucleicos da invenção podem ser administrados como uma terapêutica de combinação, isto é, um ácido nucleico que codifica a cadeia leve e ácido nucleico que codifica a cadeia pesada. O ácido nucleico pode ser administrado por via intravenosa, via intradérmica, via intramuscular, via oral ou por outras vias. Prefere-se administração intradérmica ou intramuscular devido a que estes tecidos contêm células dendríticas.

Como é utilizado no presente documento, o termo "tratamento" inclui qualquer regime que possa beneficiar a um ser humano ou animal não humano. O tratamento pode ser de uma doença herdada ou adquirida. Preferivelmente, o tratamento é de uma afecção/distúrbio associado com proliferação celular tal como

cancro ou doença infecciosa. Os exemplos de tipos de cancro que podem ser tratados com o ácido nucleico incluindo qualquer tumor sólido, cancro colorrectal, tumores de pulmão, mama, gástrico, de ovário, uterino, de fígado, de rim, pancreático, melanoma, de bexiga, de cabeça e pescoço, cerebral, esofágico, pancreático e de osso, assim como cancros de tecido mole e leucemias.

O ácido nucleico pode ser utilizado em combinação com um portador ou portadores farmacêuticamente aceitáveis. Tais portadores podem incluir, mas sem limitação, solução salina, solução salina tamponada, dextrose, lipossomas, água, glicerol, etanol e combinações dos mesmos.

Podem ser utilizados adjuvantes para facilitar a estimulação da resposta imune do hospedeiro e podem incluir hidróxido de alumínio, lisolecitina, pluronic, polióis, polianióes, péptidos, proteínas e emulsões em óleo.

Os ácidos nucleicos úteis na invenção podem ser formulados em composições farmacêuticas. Estas composições podem compreender, além de uma das substâncias anteriores, um excipiente, portador, tampão, estabilizador farmacêuticamente aceitável ou outros materiais bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Tais materiais deveriam ser não tóxicos e não deveriam interferir com a eficácia do princípio activo. A natureza exacta do portador ou outro material pode depender da via de administração, por exemplo, vias intradérmica, oral, intravenosa, cutânea ou subcutânea, nasal, intramuscular, intraperitoneal. A formulação é preferivelmente ácido nucleico como um pó seco estável precipitado na superfície de partículas de ouro microscópicas e adequado para injeção por meio de uma pistola génica. A formulação pode ser adequada para administração intradérmica ou intramuscular utilizando electroporação.

As composições que compreendem, ou para distribuição de, ácidos nucleicos são administradas preferivelmente a um indivíduo numa "quantidade terapeuticamente eficaz", sendo suficiente esta para mostrar benefício ao indivíduo. A quantidade real administrada, e a taxa e ciclo temporal de administração, dependerá da natureza e gravidade do que é tratado. A prescrição de tratamento, por exemplo, decisões sobre a dosagem etc., está dentro da responsabilidade dos facultativos gerais e outros

doutores em medicina e tipicamente leva em consideração o distúrbio a tratar, a condição do paciente individual, o local de distribuição, o método de administração e outros factores conhecidos pelos facultativos. Os ácidos nucleicos da invenção são particularmente relevantes para o tratamento de cancro existente e na prevenção da recaída de cancro depois do tratamento inicial ou cirurgia. Os exemplos das técnicas e protocolos mencionados anteriormente podem ser encontrados em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edição, Oslo, A. (ed), 1980.

Preferivelmente, o ácido nucleico da invenção estimula linfócitos T auxiliares e/ou citotóxicos que podem inibir de forma significativa o crescimento de células tumorais quando são administrados num ser humano numa quantidade eficaz. A dose óptima pode ser determinada pelos médicos com base em vários parâmetros incluindo, por exemplo, idade, sexo, peso, gravidade da afecção a tratar, o princípio activo que é administrado e a via de administração. Por exemplo, uma dose de 1-1000 µg de ADN é suficiente para estimular respostas de linfócitos T tanto auxiliares como citotóxicos.

Os ácidos nucleicos da invenção podem ser administrados juntamente com ingredientes farmacêuticamente aceitáveis adicionais. Tais ingredientes incluem, por exemplo, estimuladores do sistema imune.

Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, simultaneamente ou sequencialmente dependendo da afecção a tratar. Outros tratamentos de cancro incluem outros anticorpos monoclonais, outros agentes quimioterapêuticos, outras técnicas de radioterapia ou outra imunoterapia conhecida na matéria. Uma aplicação particular das composições da invenção é como um auxiliar para cirurgia, isto é para ajudar a reduzir o risco de reaparição de cancro depois de que tenha sido retirado um tumor.

As injecções (id) podem ser a via primária para administração terapêutica do ácido nucleico da presente invenção.

Os ácidos nucleicos podem ser administrados de uma maneira localizada a um local tumoral ou outro local desejado ou podem ser distribuídos de uma maneira em que se dirijam a tumor ou outras células.

A dose de ácido nucleico dependerá das propriedades do agente utilizado, por exemplo, sua actividade de união e semivida em plasma *in vivo*, a concentração do polipéptido na formulação, a via de administração, o local e a taxa de dosagem, a tolerância clínica do paciente implicado, a afecção patológica que aflige o paciente e similares, como está dentro da experiência do médico. Por exemplo, preferem-se doses de 100 µg de ácido nucleico por paciente por administração, embora as dosagens possam variar de aproximadamente 10 µg a 1 mg por dose. ão utilizados diferentes dosagens durante uma série de inoculações sequenciais; o facultativo pode administrar uma inoculação inicial e depois reforçar com doses relativamente mais pequenas de ácido nucleico.

É revelado no presente documento um procedimento para obter por engenharia genética, epítomos de linfócitos T de antigénios alvo nas regiões variáveis de anticorpos e a utilização de tais anticorpos obtidos por engenharia genética como vacinas para estimular respostas de linfócitos T tanto auxiliares como citotóxicos.

Também se revela no presente documento uma célula hospedeira que contém um ácido nucleico como é revelado no presente documento. O ácido nucleico da invenção pode ser integrando no genoma (por exemplo, cromossoma) da célula hospedeira. A integração pode ser promovida por inclusão de sequências que promovem a recombinação com o genoma de acordo com técnicas convencionais. O ácido nucleico pode estar num vector extracromossómico dentro da célula ou ser de outra forma heterólogo de forma identificável ou alheio à célula.

Também se revela no presente documento um método, que compreende introduzir o ácido nucleico da invenção numa célula hospedeira. A introdução, que pode (particularmente para introdução *in vitro*) geralmente ser denominada sem limitação "transformação", pode emplear qualquer técnica disponível. Para células eucariotas, as técnicas adequadas podem incluir transfecção de fosfato de cálcio, DEAE-Dextrano, electroporação, transfecção mediada por liposoma e transducção utilizando retrovírus ou outro vírus, por exemplo, vaccinia ou, para células de insecto, baculovírus. Para células bacterianas, as técnicas adequadas podem incluir transformação com cloreto de cálcio,

electroporação e transfecção utilizando bacteriófago. Como alternativa, pode ser utilizada injeção directa do ácido nucleico.

Podem ser utilizados genes marcadores tais como genes de sensibilidade ou resistência a antibióticos na identificação de clones que contêm o ácido nucleico de interesse, como conhece-se bem na técnica.

A introdução pode ser seguida provocando ou permitindo a expressão do ácido nucleico, por exemplo, cultivando as células hospedeira (que podem incluir células de facto transformadas, embora mais provavelmente as células serão descendentes das células transformadas) em condições para a expressão do gene, de modo que é produzido o polipéptido (ou péptido) codificado. Se o polipéptido expressa-se acoplado a um péptido líder de sinal apropriado, pode ser secretado da célula ao meio de cultivo. Após a produção por expressão, pode ser isolado um polipéptido ou péptido e/ou ser purificado da célula hospedeira e/ou meio de cultivo, conforme seja o caso, e posteriormente ser utilizado como for desejado, por exemplo, na formulação de uma composição que pode incluir um ou mais componentes adicionais, tal como uma composição farmacêutica que inclui um ou mais excipientes, portadores ou veículos farmacêuticamente aceitáveis (por exemplo, veja-se posteriormente).

Revela-se no presente documento um método para identificar epítomos de linfócitos T num antigénio candidato, que compreende:

- esgotar os linfócitos T reguladores num animal não humano;
- imunizar ao animal não humano com um antigénio candidato; e
- explorar para ver se foi induzida uma resposta de linfócitos T contra péptidos para epítomos previstos no antigénio candidato ou todos os péptidos sobrepostos possíveis dentro do antigénio candidato.

O procedimento pode ser levado a cabo a cabo num animal não humano, tal como um ratinho ou uma rato. Os linfócitos T reguladores podem ser eliminados no animal não humano utilizando anticorpos anti-CD25, que opcionalmente podem ser conjugados com toxinas tais como Ontak, ou por quimioterapia tal como ciclofosfamida que preferivelmente mata linfócitos T reguladores. Uma vez que foram esgotados os linfócitos T reguladores, o animal

não humano pode ser imunizado com ADN que codifica o antígeno candidato ou por meio do antígeno candidato em si mesmo. Prefere-se que o antígeno candidato seja proporcionado como uma proteína de fusão de Fc-antígeno. Na etapa de exploração, identifica-se o péptido contra o que foi estimulada qualquer resposta de linfócitos T no animal não humano. Isto pode ser realizado *in vitro* utilizando uma técnica tal como ELISPOT. Se for induzida uma resposta de linfócitos T a um epítipo candidato, este epítipo pode ser utilizado para imunizar um animal não humano. Se este péptido induzir uma resposta de linfócitos T, a avidéz e frequência pode ser potenciada codificando o epítipo dentro de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção. Este método pode permitir a identificação de epítipos de linfócitos T que são processados pelo imunoproteasoma.

A invenção será descritas agora adicionalmente nos seguintes exemplos não limitativos. É feita referência aos seguintes desenhos:

Figura 1; Mapa que representa os elementos do vector de cadeia pesada pOrigHIB. A região variável pesada desimunizada de tipo selvagem do anticorpo SC100 foi clonada utilizando HindIII/AfeI *in frame* com a região constante de Fc de IgG1 humana. A região Fc compreende os domínios CH1, CH2, CH3 e a região dobradiça. A expressão a alto nível em células de mamífero é dirigida a partir do promotor precoce imediato de citomegalovírus humano. A poliadenilação de BGH sinaliza a jusante da cadeia de IgG1 humana HIB Orig para assegurar a estabilidade do ARNm e sua terminação eficaz. EM7 é um promotor bacteriano que controla a expressão do gene de resistência a zeocina que permite a selecção por antibióticos em *E. coli* enquanto que o promotor precoce de SV40 a montante do gene de resistência permite a selecção em células de mamífero. A poliadenilação de SV40 sinaliza a jusante do gene de resistência para dirigir o processamento apropriado da extremidade 3' do ARNm zeo. O vector também contém dentro de sua cadeia principal a origem ColE1 de replicação para propagação em bactérias. As sequências de ADN determinantes de complementaridade foram retiradas eficazmente e foram mudadas por locais de restrição RE1, RE2 e RE3 (*FspI*, *MacI* e *Srf I* respectivamente) de forma simples e em combinação.

Figura 2: Mapa que representa os elementos do vector de cadeia pesada pOrigLIB. A região variável leve desimmunizada de tipo selvagem do anticorpo SC100 foi clonada utilizando BamHI/BsiWI *in frame* com a região constante kappa humana. A expressão de alto nível em células de mamífero é dirigida desde o promotor precoce imediato de citomegalovírus humano. A poliadenilação de BGH sinaliza a jusante da cadeia de Orig LIB para assegurar a estabilidade do ARNm e sua terminação eficaz. O vector também inclui a origem de replicação ColE1 e o gene de resistência a antibióticos para ampicilina que permite a propagação e selecção em bactérias. As regiões determinantes de complementaridade foram retiradas eficazmente e foram mudadas pelos locais de restrição RE4, RES e RE6 (*EcoRV*, *Ssp I* e *Hpa I* *FspI*, *MacI* e *Srf I* respectivamente) de forma simples e em combinação.

Figura 3: Sequência da cadeia pesada quimérica de Immunobody de tipo selvagem. A sequência de nucleótidos e de aminoácidos em tradução é ilustrada para a cadeia pesada de IgG1 quimérica de comprimento completa. As localizações CDR estão dentro de caixas definidas pelo esquema de numeração de kabat. O codão de parada é representado por um asterisco vermelho. Destacam-se os locais de restrição de *HindIII/Afe I* utilizados na transferência da região pesada variável.

Figura 4: Sequência da cadeia kappa quimérica de Immunobody de tipo selvagem. São ilustradas as sequências de nucleótidos e de aminoácidos em tradução para a cadeia de kappa quimérica de comprimento completa. As localizações de CDR estão dentro de caixas definidas pelo esquema numérico de kabat. O codão de parada é representado por um asterisco. Destacam-se os locais de restrição de *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região leve variável.

Figura 5: PCR de extensão sobreposta

Foram retiradas as CDR e foram substituídas com locais de restrição únicos por meio de PCR sobreposta. Os iniciadores directos H1, H2, H3, L1, L2 e L3 (Quadro 2) foram desenhados para substituir CDR1, 2 e 3 dentro da Região variável da cadeia pesada e leve respectivamente. Cada iniciador continha, localizado de forma central, a sequência de reconhecimento enzimático única seleccionada desprovida da sequência CDR a retirar (secção verde)

e flanqueada por 10-20 pb de sequência de tipo selvagem. Os iniciadores directos foram utilizados num primeiro ciclo de PCR juntamente com um iniciador reverso geral, huHeClonR ou huLiClonR (Quadro 2), que hibrida com os domínios constantes pesados e leves humanos dentro das construções de tipo selvagem pOrigHIB e pOrigLIB respectivamente. O fragmento gerado não contém sequência CDR de tipo selvagem (secção vermelha), mas se intercambia eficazmente pelo local de restrição. Para amplificar a região pesada e leve variável completa, é requerido um segundo ciclo de PCR utilizando o produto de PCR gerado do primeiro ciclo como um iniciador reverso com o iniciador directo de CMV geral que hibrida com o promotor de CMV dentro dos plasmídeos simples. Foram subclonados produtos de PCR de segundo ciclo em pCR 2,1 (Invitrogen) e, depois da confirmação da sequência, as regiões variáveis pesada/leve (VH e VL) que continham versões H1, H2, H3, L1, L2 e L3 de forma simples, em combinação e juntas foram inseridas de novo nas construções simples pOrigHIB e pOrigLIB, permutando as regiões de tipo selvagem utilizando HindIII/AfeI e BamHI/BsiWI respectivamente.

Figura 6: Sequência da Região variável da cadeia pesada de ImmunoBody. Sequência de nucleótidos e aminoácidos da região variável pesada em que as CDR foram substituídas com seu local de enzima correspondente H1, H2 e H3, de forma simples, em combinação e juntos. Destacam-se os locais de enzima de restrição únicos. CDR1, 2 e 3 foram substituídas com *FspI*, *MscI* e *SrfI* respectivamente.

Figura 7: Sequência da Região variável da cadeia kappa de ImmunoBody. Sequência de nucleótidos e aminoácidos da região variável pesada em que as CDR foram substituídas com seu local de enzima correspondente L1, L2 e L3, de forma simples, em combinação e juntos. Destacam-se os locais de enzima de restrição únicos. CDR1, 2 e 3 foram substituídas com *EcoRV*, *SspI* e *HpaI* respectivamente.

Figura 8: Mapa que representa os elementos do vector de expressão duplo pDCOrig. Uma vez que todos os epítomos foram incorporados nos locais pesados variáveis e leves variáveis dentro dos vectores simples, são transferidos ao vector de expressão duplo utilizando como se destaca HindIII/AfeI e BamHI/BsiWI em

quadro com suas regiões constantes humanas respectivas. A região Fc da cadeia pesada compreende os domínios CH1, CH2, CH3 e a região dobradiça. A expressão de alto nível das cadeias tanto pesadas como leves em células de mamífero é dirigida desde o promotor precoce imediato de citomegalovírus humano. A poliadenilação de BGH sinaliza a jusante de ambas cadeias para assegurar a estabilidade do ARNm e sua terminação eficaz. EM7 é um promotor bacteriano que controla a expressão do gene de resistência a zeocina permitindo a selecção por antibióticos em *E. coli* enquanto que o promotor precoce de SV40 a montante do gene de resistência permite a selecção em células de mamífero. A poliadenilação de SV40 sinaliza a jusante do gene de resistência com a finalidade de dirigir o processamento apropriado da extremidade 3' do ARNm zeo. O vector também contém dentro de sua cadeia principal a origem ColE1 de replicação para propagação em bactérias.

Figura 9: Sequência da cadeia pesada de IB15 de immunobody que contém um codão de parada que evita a síntese da região Fc.

Sequência de nucleótidos e aminoácidos da cadeia pesada quimérica, pDCOrig IB15 CH1 parada. Foi inserido um codão de parada por mutagénese dirigida depois do domínio CH1 da região constante de Fc de IgG1 humana como é representado por um asterisco. Os nucleótidos e aminoácidos em negrito representam o domínio CH1. Os aminoácidos dentro de caixas representam o epítopo GP100210M em H1 (TIMDQVPFSV) e o epítopo TRP2 em H2 (SVYDFFVWL). Destacam-se os locais de restrição de *HindIII*/*Afe* I utilizados na transferência da região pesada variável da construção simples.

Figura 10: Sequência de nucleótidos e aminoácidos da região variável pesada de DCIB15 sem um líder.

O líder é retirado por meio de PCR utilizando o iniciador directo pOrig pesado sem líder com o iniciador reverso huHeClonR (Quadro 2) que se une ao domínio CH1 de IgG1 humana reamplificando eficazmente a região variável pesada (V_H). Depois de confirmação de sequência, a região V_H sem líder é clonada de novo na construção de expressão dupla DCIB15 utilizando *HindIII*/*Afe*I *in frame* com a região constante de IgG1 humana. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítopo de GP100210M em H1 (TIMDQVPFSV) e o epítopo

TRP2 em H2 (SVYDFFVWL). Os locais de restrição *HindIII/Afe I* utilizado na transferência da região variável pesada destacam-se.

Figura 11: Sequência de nucleótidos e aminoácidos da região variável kappa de DCIB15 sem um líder.

O líder foi retirado por meio de PCR utilizando o iniciador directo pOrig leve sem líder, reamplificando o iniciador reverso huLiClonR (Quadro 2) a região variável leve (V_L). Depois da confirmação de sequência, a região V_L sem líder é clonada de novo na construção de expressão dupla DCIB15 utilizando *BamHI/BsiWI* in frame com a região constante kappa humana. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de HepB CD4 em L_1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição de *BamHI/BsiWII* utilizados na transferência da região leve variável.

Figura 12: Sequência de região constante de IgG2 humana

Sequência de nucleótidos e aminoácidos da região constante de IgG2 humana pesada amplificada. Destacam-se os locais de restrição *AfeI* e *SapI* utilizados na transferência e substituição da região constante de huigG1 no vector de expressão duplo DCIB15.

Figura 13: Sequência de região constante de IgG3 humana

Sequência de nucleótidos e aminoácidos da região constante de IgG2 humana pesada amplificada. Destacam-se os locais de restrição de *AfeI* e *SapI* utilizados na transferência e substituição da região constante de huigG1 no vector de expressão duplo DCIB15

Figura 14: Isotipos humanos do vector de expressão duplo de immunobody.

A Mapa do vector de expressão duplo pDCOrigIB15 huigG2.

B Mapa do vector de expressão duplo pDCOrigIB15huigG3. Destacam-se os locais de restrição *HindIII/AfeI* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região pesada e leve variável.

Figura 15: Sequência de cadeia pesada de DCIB66 que contém o motivo G2. Sequência de nucleótidos e aminoácidos da cadeia pesada quimérica. Os aminoácidos E233 L234 L235 dentro de um motivo de união crítico para a interacção com o FcyR1 de alta afinidade (CDR64) foram substituídos com P233 V234 A235 de IgG2 humana destacada em negrito dentro de uma caixa. Outros aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100210M em H1 (TIMDQVPFSV) e o epítipo de TRP2 em H2 (SVYDFFVWL).

Os locais *AgeI/AhdI* destacados foram utilizados na transferência da secção que contém as substituições a pDCOrigIB15 huigG1. Os locais de restrição *HindIII/AfeI* utilizados na transferência da região pesada variável se representam em negrito.

Figura 16: Sequência de cadeia pesada de DCIB67 que contém o motivo de união G1. Sequência de nucleótidos e aminoácidos da cadeia pesada quimérica. Os aminoácidos P233 V234 A235 dentro da região constante de IgG2 humana foram substituídos com o motivo de união crítico para interacção com o FcyR1 de alta afinidade (CDR64) E233 L234 L235 G236 de IgG1 humana destacadas em negrito dentro de uma caixa. Outros aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100210M em H1 (TIMDQVPFSV) e o epítipo de TRP2 em H2 (SVYDFFVWL).

Os locais *AgeI/AhdI* destacados foram utilizados na transferência da secção que contém as substituições a pDCOrigIB15 huigG1. Os locais de restrição *HindIII/AfeI* utilizados na transferência da região variável pesada se representam em negrito.

Figura 17: Vectors de expressão de Immunobody de IgG2a murina. Mapas de (A) vector pMoOrigHIB de cadeia simples, (B) vector de expressão duplo DCIB53 que contém o epítipo de GP100210M em H1 (TIMDQVPFSV), o epítipo de TRP2 em H2 (SVYDFFVWL) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL) e (C) vector de expressão duplo OGIB63 que contém o epítipo de gp100 CD4 restringido por HLA-DR7 (GTGRAMLGHTMEVTVYH) em H1, o epítipo de TRP2 (SVYDFFVWL) em H2 e o epítipo de gp100 CD4 restringido por HLA-DR4 em H3 (WNRQLYPEWTEAQRLO). Representam-se os locais de restrição utilizados.

Figura 18: Diagrama esquemático para representar a construção do plasmídeo conforme regulador pVAXDCIB54.

O vector de cadeia simples pesado pVaxIB54 HIB (A) foi linearizado utilizando *NruI*. O cassete de expressão de cadeia leve de pOrgLIB (B) foi excisado utilizando *NruI* e *HpaI* e foi clonado no plasmídeo linearizado para gerar o vector de expressão duplo pVaxDCIB54 (C). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/AfeI* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência de região variável pesada e leve.

Figura 19: Sequência de DCIB15

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100210M em H1 (TIMDQVPFSV), o epítipo de TRP2 em H2, (SVYDFFVWL) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 20: As construções de ImmunoBody produzem níveis baixos de proteína intacta. A, quantificação do nível de cadeia pesada de ImmunoBody por meio de ELISA de tipo sanduíche do sobrenadante de células CHO-S transfectadas com ImmunoBody que contém gp100/H1, TRP2/H2 e HepB CD4/L1 (DCIB15). Foi utilizado sobrenadante puro e diluiu-se 1 em 3, 1 em 10 e 1 em 30 em meio e foi comparado com um controlo positivo de IgG humana.

B, análise de ImmunoBody purificado que contém gp100/H1, TRP2/H2 e HepB help/L1 (DCIB15) por meio de ELISA de tipo sanduíche em comparação com um controlo positivo. C e D. Determinação da expressão de cadeia pesada e ImmunoBody intacto de sobrenadante de transfectantes de CHO-S por meio de ELISA de tipo sanduíche. As placas foram revestidas com um anticorpo específico anti-Fc humano. Para detectar a cadeia pesada foi utilizado um anticorpo de HRP específico anti-Fc de IgG humana e para detectar o ImmunoBody intacto foi utilizado um anticorpo de HRP específico anti-cadeia kappa humana. E, determinação de cadeia pesada, cadeia leve e ImmunoBody intacto de sobrenadante de transfectantes de CHO-S (DCIB15, DCI831, DCIB32, DCIB36, DCI848, DCIB49, DCIB52, DCIB54) por meio de ELISA de tipo sanduíche. Foram revestidas placas com um anticorpo específico anti-Fc humano ou anticorpo anti-cadeia kappa humano. Para detectar a cadeia pesada foi utilizado um anticorpo de HRP específico anti-Fc de IgG humana em combinação com o anticorpo de revestimento específicos anti-Fc humano. Para detectar o ImmunoBody intacto foi utilizado um anticorpo de HRP específico anti-cadeia kappa humana em combinação com anticorpo de revestimento específico anti-Fc humano. Para detectar a cadeia leve foi utilizado anticorpo de HRP específico

anti-cadeia kappa humana em combinação com o anticorpo específico anti-cadeia kappa humana.

Figura 21: Sequência de DCIB24

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de ovoalbumina em H2 (SIINFEKL) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 22 Sequência de DCIB25

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões pesadas e leves variáveis clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100210M em H1 (TIMDQVPFSV), o epítipo de TRP2 em H2 (SVYDFFVWL) e o epítipo de HepB CD4 em L3 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 23: Sequência de DCIB31

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de TRP2 (SVYDFFVWL) em H3. Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 24: Sequência de DCIB32

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de TRP2 (SVYDFFVWL) em H3 e o epítipo de HepB CD4 em L3 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 25: Sequência de DCIB36

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítopo de TRP2 (SVYDFFVWL) em L3. Destacam-se os locais de restrição *Hind*III/*Afe* I e *Bam*HI/*Bsi*WI utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 26: Sequência de DCIB48

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítopo de TRP2 (SVYDFFVWL) em H2 e o epítopo de gp100 CD4 restringido por HLA-DR4 em H3 (WNRQLYPEWTEAQRLD). Destacam-se os locais de restrição *Hind*III/*Afe* I e *Bam*HI/*Bsi*WI utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 27: Sequência de DCIB49

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítopo de HepB CD4 (TPPAYRPPNAPIL) em H3. Destacam-se os locais de restrição *Hind*III/*Afe* I e *Bam*HI/*Bsi*WI utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 28: Sequência de DCIB52

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítopo de TRP2 (SVYDFFVWL) em H2 e o epítopo de HepB CD4 (TPPAYRPPNAPIL) em H3. Destacam-se os locais de restrição *Hind*III/*Afe* I e *Bam*HI/*Bsi*WI utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 29: Sequência de DCIB54

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os

aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de gp100 CD4 restringido por HLA-DR7 (GTGRAMLGTHMEVTVYH) em H1. O epítipo de TRP2 (SVYDFFVWL) em H2 e o epítipo de gp100 CD4 restringido por HLA-DR4 em H3 (WNRQLYPEWTEAQRDL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 30: Sequência de DCIB18

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de TRP2 em H2 (SVYDFFVWL) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 31: os epítipos de CTL incorporados na armação de ImmunoBody são processados e apresentam-se para induzir uma resposta imune *in vivo*.

A, ratinhos C57BI/6 foram imunizados nos dias 0, 7 e 14 com uma construção de ImmunoBody que continha o epítipo de TRP2 em CDR H2 e o epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB18). O dia 19 foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2, péptido auxiliar de HepB e um controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B, os esplenócitos dos ratinhos imunizados foram ensaiados com respeito a avidéz para o epítipo de TRP2 medindo as respostas a concentração crescente de péptido em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % da função efectora máxima.

C, foram esgotados os linfócitos T CD8 de esplenócitos de ratinhos imunizados e foram analisados contra péptido TRP2, péptido auxiliar HepB e um controlo de meio com respeito à presença de respostas específicas de epítipo no ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

D, citotoxicidade de esplenócitos de ratinhos imunizados num ensaio de libertação de ^{51}Cr de quatro horas contra as linhas celulares de melanoma B16F10, B16F10 IFN α e B16F10 siKb depois de 6 dias de estimulação com péptido TRP2 *in vitro*.

E, ratinhos transgénicos C57BI/6 ou HLA-DR4 foram imunizados nos dias 0, 7 e 14 com ADN de ImmunoBody (DCIB15, DCIB31, DCIB32, DCIB36, DCIB48, DCIB52 e DOB54). O dia 19 os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2 e controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

F, foram ensaiados os esplenócitos de ratinhos imunizados com respeito a avidéz para o epítipo de TRP2 medindo as respostas a concentração crescente de péptido em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

G, ratinhos transgénicos C57BI/6 ou HLA-DR4 foram imunizados nos dias 0, 7 e 14 com ADN de ImmunoBody (DCIB15, DCIB31, DCIB32, DCIB36, DCIB48, DCIB52 e DOB54). No dia 19 os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido auxiliar HepB (DOB15, DCIB49 e DCIB52) ou péptido auxiliar gp1 OODR4 (DCIB48 e DCIB54) e um controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

Figura 32: A imunização com ADN de ImmunoBody é melhor que a imunização com péptidos ou imunização com antigénio completo.

A, foi comparada a imunização com ADN de ImmunoBody (misturas DOB18) com a imunização s.c. com epítipo peptídico em adjuvante incompleto de Freund ou imunização com um ADN que expressa antigénio de TRP2. Foram imunizados ratinhos C57BI/6 nos dias 0, 7 e 14 e no dia 19 foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2 (■), péptido auxiliar HepB (▣) e um controlo de meios (□). As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B, foram ensaiados os esplenócitos de ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody (◇) e péptido (◆) com respeito a avidéz para o epítipo de TRP2 medindo as respostas a concentração crescente de péptido em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas

como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

C, citotoxicidade de esplenócitos de ratinhos imunizados num ensaio de libertação de ^{51}Cr de 4 horas contra as linhas celulares de melanoma B16F10 (■), B16F10 IFN α (▨) e B16F10 siKb (□) depois de 6 dias de estimulação com péptido TRP2 *in vitro*.

D, foi comparada a imunização com ADN de ImmunoBody (DCIB18) com a imunização com DC pulsadas com péptido TRP2. Foram imunizados ratinhos C57BI/6 nos dias 0, 7 e 14 e no dia 19 foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra quantidades de titulação de péptido TRP2. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

E, foi comparada a imunização com ADN de ImmunoBody (DCIB18) com a imunização com DC pulsadas com péptido TRP2. Foram imunizados ratinhos C57BI/6 nos dias 0, 7 e 14 e no dia 19 os esplenócitos foram estimulados *in vitro* com blastos de LPS pulsados com péptido TRP2. Seis dias depois da estimulação foram avaliadas as linhas de CTL por meio de ensaio de libertação de cromo com respeito à capacidade para lisar linhas de melanoma B16F10 ou B16F10 siKb. As respostas foram medidas como % de citotoxicidade.

F, foi comparada a imunização com ADN de ImmunoBody (DCIB24) com a imunização com péptido SIINF EKL. Foram imunizados ratinhos C57BI/6 nos dias 0, 7 e 14 e no dia 19 foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido SIINF EKL e um péptido de controlo. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

G, foi comparada a imunização por ADN de ImmunoBody (DCIB15) com a imunização com péptido gp100 210M. Foram imunizados ratinhos HHDII nos dias 0, 7 e 14 e no dia 19 foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra quantidades de titulação de péptido gp100 210M e um controlo. Foram medidas as respostas de controlo como pontos/milhões de esplenócitos.

H, foi comparada a imunização com ADN de ImmunoBody (DCIB24) com a imunização com péptido SIINF EKL. Foram imunizados ratinhos

C57BI/6 nos dias 0, 7 e 14 e no dia 19 foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra quantidades de titulação de péptido SIINFEKL. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

I, foi comparada a imunização com ADN de ImmunoBody (DCIB15) com a imunização com péptido gp100 210M. Foram imunizados ratinhos HHDII nos dias 0, 7 e 14 e no dia 19 foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra quantidades de titulação de péptido gp100 210m. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

Figura 33: Sequência de DCIB21

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões pesadas e leves variáveis clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de HepB S Ag TRP2 em H2 (IPQSLDSWWTSL) e o epítipo Flu HA CD4 restringido com I-Ad em L1 (FERFEIFPLE). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 34: epítipos múltiplos podem ser processados a partir do local CDR H2.

A, foram imunizados ratinhos C57BI/6 nos dias 0, 7 e 14 com construção de ImmunoBody que continha epítipo SIINFEKL em CDR H2 e epítipo HepB CD4 em CDR L1 (DCIB24). No dia 19 foram analisados os esplenócitos em ensaio de elispot de IFN γ contra péptido SIINFEKL, um péptido irrelevante, péptido HepB CD4 e controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B, foram imunizados ratinhos Balb/c nos dias 0, 7 e 14 com construção de ImmunoBody que continha epítipo de HepB CDB em CDR H2 e epítipo de Flu HACD4 em CDR L1 (DCIB21). No dia 19 foram analisados os esplenócitos em ensaio de elispot de IFN γ contra péptido HepB CD8, um péptido irrelevante, péptido Flu HA CD4 e controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

Figura 35: Sequência de OCIB17

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100210M em H1 (TIMDQVPFSV) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 36: Sequência de DCIB26

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões pesada e leve variáveis clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de Tie-2 Z84 em H1 (FLPATLTMV) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 37: Podem ser processados múltiplos epítipos de CTL da região variável.

A, foram imunizados ratinhos HHDII nos dias 0, 7 e 14 com construção de ImmunoBody que continha epítipo de gyp100 IMDQVPFSV em CDR H1 com retirada de parte do armação e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB17). No dia 19 foram analisados os esplenócitos em ensaio de elispot de IFN γ contra péptido de gp100 IN1DQVPFSV, péptido HepB CD4 e controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B, foram imunizados ratinhos HHDII nos dias 0, 7 e 14 com construção de ImmunoBody que continha epítipo de Tie2 em CDR H1 com retirada de parte da região *framework* e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB26). No dia 19 foram analisados os esplenócitos em ensaio de elispot de IFN γ contra péptido Tie2, péptido HepB CD4 e controlo de meios. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

Figura 38: Podem ser geradas respostas de CTL múltiplos de diferentes epítipos dentro da mesma construção de ImmunoBody. O epítipo de gp100 IMDQVPFSV restringido por HLA-A2 foi obtido por engenharia genética no local CDR H1 juntamente com o epítipo de

TRP2 SVYDFFVWL em CDR H2 e o epítipo de HepB CD4 estava presente no local CDR L1 (DCIB15).

A, foram imunizados ratinhos HHDII nos dias 0, 7 e 14 com ADN de ImmunoBody. No dia 19 foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido gp100, péptido TRP2, péptido auxiliar HepB e um controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B, foram ensaiados esplenócitos de ratinhos imunizados com respeito a avidéz para o epítipo de gp100 modificado IMDQVPFSV (◆), epítipo de gp100 wt ITDQVPFSV (▲) e epítipo TRP2 (■) medindo as respostas a concentração de péptido crescente em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

C, citotoxicidade dos esplenócitos de ratinhos imunizados num ensaio de libertação de ^{51}Cr de 4 horas contra linfócitos T2 pulsados com péptido gyp100 IMDQVPFSV, péptido TRP2 ou controlo e as linhas celulares de melanoma B16F10 e B16F10 HHD.

D, foram imunizados ratinhos HHDII nos dias 0, 7 e 14 com ADN de ImmunoBody que continha 1) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB15) ou ii) epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB18). No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido gp100 (■), péptido TRP2 (■), péptido auxiliar HepB (■) e um controlo de meio (□). As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

E, foram imunizados ratinhos C57BI/6 i.m. com 10 μg de solução de ADN combinada com electroporação. Foram realizadas imunizações três vezes a intervalos semanais nos músculos tibiais. Os ratinhos foram imunizados com DCIB24 ou OCIB18 somente, ambos combinados no mesmo local ou com ambos ao mesmo tempo mas em locais separados. No dia 19 foram analisados os esplenócitos com respeito à presença de respostas imunes específicas de péptido de TRP2, SIINFEKL. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

Figura 39: Sequência de DCIB37

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis leves e pesadas clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os

aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100 F7L em H1 (TITDQVPLSV) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 40: Sequência de DC1840

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões pesadas e leves variáveis clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100 F71 em H1 (TITDQVPISV) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 41: Sequência de DGIB41

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes Fc e kappa de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de tipo selvagem de GP100 em H1 (TIMDQVPFSV) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 42: Sequência de DCIB42

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100 F7Y em H1 (TITDQVPYSV) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 43: Sequência de DCIB43

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100 V5L em H1 (TITDQLPFSV) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL).

Destacam-se os locais de restrição de *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 44: A modificação nos resíduos não de ancoramento pode potenciar a imunogenicidade de epítomos.

Foram imunizados ratinhos HHDII nos dias 0, 7 e 14 com construções de ImmunoBody que continham epítomos de gp100 modificados na região CDR H1 (DCIB37, DCIB40, DCIB41, DCIB42 e OCIB43). No dia 19, foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido epitópico de tipo selvagem de gp100 e um controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

Figura 45: Sequência de DCIB35

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões pesadas e leves variáveis clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítomo de GP100210M em H1 (TIMOAVPFSV), o epítomo de TRP2 em H2 (SVYDFVWL) e o epítomo de gp100 CD4 restringido por HLA-OR4 em L1 (WPIRQLYPEWTEAQRDL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 46: Múltiplas respostas auxiliares de CD4 podem ser processadas e apresentadas para induzir uma resposta imune *in vivo*.

A. Foram imunizados ratinhos HHDII ou C57Bl/6 nos dias 0, 7 e 14 com construções de ImmunoBody que continham o epítomo de HepB CD4 restringido com I-Ab na região CDR L1 (DCIB15).

B, foram imunizados ratinhos Balb/c nos dias 0, 7 e 14 com construção de ImmunoBody que continham o epítomo de Flu HA CD4 restringido com I-Ad na região CDR L1 (DCIB21).

C, foram imunizados ratinhos transgênicos HLA-DR4 nos dias 0, 7 e 14 com construções de ImmunoBody que continham o epítomo de gp100 CD4 restringido com HLA-DR4 na CDR L1 (DCIB35). No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra o péptido correspondente, um péptido irrelevante e um controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

D. Foram imunizados ratinhos transgênicos HLJ-DR4 nos dias 0, 7 e 14 com construções de ImmunoBody que continham o epítipo de gyp100 CD4 restringido com HLA-CD4 na CDR L1 (DCIB35), na CDR H3 (DCIB54) e na CDR L3 (DOISSO). No dia 19, foram analisados os esplenócitos por meio de ensaio elispot de IFN γ contra o péptido correspondente, um péptido irrelevante e um controlo de meio. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

Figura 47: Sequência de DCIB50

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100210M (TIMDQVPFSV) em H1, o epítipo de TRP2 (SVYDFFVWL) em H2 e o epítipo de gp100 CD4 restringido com HLA-DR4 (WNRQLYPEWTEAQRDL) em L3. Destacam-se os locais de restrição *HindIII*/Afe I e *BamHI*/*BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 48: As respostas de linfócitos T CD8 dependem parcialmente da cadeia pesada secretada, mas as respostas auxiliares não requerem cadeia leve secretada.

A, foram imunizados ratinhos HHDII no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody que continham i) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB15), ii) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 sem a sequência líder na cadeia pesada, iii) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 sem a sequência líder na cadeia leve. No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptidos gp100 (■) e HepB CD4 (▣) e um controlo de meio (□). As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B, determinação de cadeia pesada, cadeia leve e ImmunoBody intacto de sobrenadante de transfectantes de CHO-S por meio de ELISA de tipo sanduíche. As placas foram revestidas com um anticorpo específico anti-Fc humano ou anticorpo anti-cadeia kappa humana. Para detectar a cadeia pesada foi utilizado um anticorpo de HRP específico anti-Fc de IgG humana em combinação com o anticorpo de revestimento específico anti-Fc humano. Para

detectar o ImmunoBody foi utilizado um anticorpo de HRP específico anti-cadeia kappa humana em combinação com anticorpo de revestimento específico anti-Fc humano. Para detectar a cadeia leve foi utilizado anticorpo de HRP específico de anti-cadeia kappa humana em combinação com o anticorpo específico anti-cadeia kappa humana.

C, foram imunizados ratinhos C57BI/6 no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody que continham i) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB15), ii) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 sem a sequência líder na cadeia pesada. No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

D, foram imunizados ratinhos C57BI/6 no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody que continham i) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB15), ii) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 sem a sequência líder na cadeia pesada. No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido auxiliar HepB. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

Figura 49: A região Fc de ImmunoBody é benéfica para estabelecer uma resposta imune eficaz.

A, foram imunizados ratinhos C57BI/6 no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody que continham i) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB15), ii) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 sem a região Fc. No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2 (■), um controlo de meio (□), a linha de melanoma B16F10 (■) e a linha celular de controlo negativo B16F10 siKb (■). As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B, foram imunizados ratinhos C57BI/6 no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody que continham i) epítipo de gp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de HepB CD4 em CDR L1 (DCIB15), ii) epítipo de gyp100 em CDR H1, epítipo de TRP2 em

CDR H2 e epítopo de HepB CD4 em CDR L1 sem a região Fc. No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

C, os mesmos ratinhos foram analisados com respeito a respostas específicas para o epítopo auxiliar HepB. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

D, os esplenócitos de ratinhos imunizados com DCIB15 ou DCIB15 sem a região Fc (DCIB15 FcStop) foram ensaiados com respeito a avidéz para o epítopo de TRP2 medindo as respostas a concentração de péptido crescente em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

E, foram imunizados ratinhos C57BI/6 no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody que continham i) epítopo de gp100 em CDR H1, epítopo de TRP2 em CDR H2 e epítopo de HepB CD4 em CDR L1 de IgG humana (DCIB15), ii) a mesma construção com região constante de IgG2 humana (DCIB33), iii) a mesma construção com região constante de IgG3 humana (DCIB65), iv) a mesma construção com o motivo de união a IgG1 humana substituído com o motivo de ligação de IgG2 humana (DCIB66) e v) DCIB33 com o motivo de ligação substituído pelo motivo de IgG1 humana (DCIB67). No dia 19 os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2 (■), um controlo de meio (□) e o péptido auxiliar HepB (⊗). As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

F, determinação de cadeia pesada, cadeia leve e ImmunoBody intacto de sobrenadante de transfectantes de CHO-S (DCIB15, DCIB33, DCIB65, DCIB66 e DCIB67) por meio de ELISA de tipo sanduíche. As placas foram revestidas com um anticorpo específico anti-Fc humano ou anticorpo anti-cadeia kappa humana. Para detectar a cadeia pesada foi utilizado um anticorpo de HRP específico de anti-Fc de IgG humana em combinação com o anticorpo de revestimento específico anti-Fc humano. Para detectar o ImmunoBody intacto foi utilizado anticorpo de HRP específico anti-cadeia kappa humana em combinação com anticorpo de revestimento específico anti-Fc humano. Para detectar a cadeia leve foi

utilizado anticorpo de HRP específico anti-cadeia kappa humana em combinação com o anticorpo específico anti-cadeia kappa humana.

G, determinação de ImmunoBody de cadeia pesada de sobrenadante de CHO-S transfectadas com DCIB53 por meio de ELISA de tipo sanduíche. As placas foram revestidas com um anticorpo específico anti-Fc de ratinho. Para detectar a cadeia pesada foi utilizado um anticorpo de HRP específico anti-IgG2a de ratinho.

Figura 50: a imunização com ImmunoBody potencia as respostas imunes e supera a regulação observada de antígeno completo.

A, foram imunizados ratinhos transgênicos HLA-A2 (HHDFII) no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody DCIB15 ou antígeno gp100 completo no vector pcDNA3. No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido gp100 ou controlo. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B, nos ratinhos C57BI/6 foram esgotados as células positivas para CD25 por injeção de 400 μ g i.p. de anticorpo anti-CD25 (PCR61). Tanto os ratinhos esgotados para CD25 como os animais não esgotados foram imunizados posteriormente no dia 4, 11 e 18 com construções de ADN de ImmunoBody DCIB15 ou antígeno TRP2 completo no vector pOrig. No dia 23, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2 ou controlo. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

C e D, os ratinhos HHDII foram deixados sem tratar (c) ou foram tratados com 400 μ g de mAb PC61 i.p., (d). 4 dias depois, todos os ratinhos foram imunizados com a construção de ADNc Tie2 C200HFc. As imunizações de ADN repetiram-se a intervalos de 7 dias para um total de 3 imunizações. 6 dias depois da imunização final, os esplenócitos foram colhidos e estimulados de novo num ensaio de ELISPOT de IFN γ ex vivo com 1 μ g/ml de cada um dos epítomos de CTL previstos de Tie-2. As barras indicam a média dos valores em triplicata para cada ratinho individual, normalizados a controlos de fundo, representando as barras de erro o desvio típico da média.

E e F, os ratinhos HHDII foram deixados sem tratar (e) ($n = 3$) ou foram tratados (f) ($n = 2$) com 400 μ g de anticorpo PC61 i.p. Depois de 4 dias, todos os ratinhos foram imunizados com 100 μ g de péptido Z12 e 100 μ g de péptido Z48, misturados 1:1 em IFA (s.c.).

Foram administradas imunizações de péptidos repetidas 7 dias depois da primeira imunização com péptido. Os esplenócitos foram colhidos 14 dias depois da imunização final e estimulados de novo com péptido 212 1 $\mu\text{g/ml}$ (barras pretas) ou somente meio (barras abertas) num ensaio de elispot de IFN γ . As barras indicam a média dos valores em triplicata representando as barras de erro o desvio típico da média.

G, foram imunizados ratinhos HHDII com 100 μg de péptido Z12 misturado 1:1 em IFA (s.c). Foram administradas imunizações com péptidos repetidas nos dias 7 e 14 dias depois da primeira imunização com péptido. Os esplenócitos foram colhidos 7 dias depois da imunização final e foram analisados com respeito à presença de respostas específicas de epítopo a concentração de péptido crescente em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas de ratinhos individuais como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

H, foram imunizados ratinhos HHDII com construção de ADN de ImmunoBody DCIB71 por meio de pistola génica nos dias 0, 7 e 14. Foram colhidos os esplenócitos 7 dias depois da imunização final e foram analisados com respeito à presença de respostas específicas de epítopo a concentração de péptido crescente em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas de ratinhos individuais como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

Figura 51: Sequência de DCIB71

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões pesadas e leves variáveis clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítopo de Tie-2 Z12 (ILINSLPLV) em H1 e o epítopo de HepB CD4 (TPPAYRPPNAPIL) em L1. Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 52: Sequência de DCIB72

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões pesada e leve variáveis clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os

aminoácidos dentro das caixas representam o epítopo Tie-2 Z12 (ILINSLPLV) em H2 e o epítopo HepB CD4 (TPPAYRPPNAPIL) em L1. Destacam-se os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 53: O papel de Fc xenogénico ao proporcionar ajuda de linfócitos T e o requisito de ajuda de linfócitos T específica de antígeno.

A, foram imunizados ratinhos C57BI/6 ou HHDII no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody de cadeia pesada que continham epítopo de gp100 em CDR H1 ou epítopo de TRP2 em CDR H2 (IB17 e IB18 respectivamente). No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido gp100 ou péptido TRP2 e controlo. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B, foram ensaiados esplenócitos de ratinhos imunizados com cadeia pesada de ImmunoBody que continha epítopo de TRP2 em CDR H2 com respeito a avidéz para o epítopo de TRP2 medindo as respostas a concentração de péptido crescente em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

C, foram imunizados ratinhos C57BI/6 no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody que continham epítopo de gp100 em CDR H1, epítopo de TRP2 em CDR H2 e epítopo de HepB CD4 em CDR L1 de IgG1 humana (DCIB15) ou epítopo de gp100 em CDR H1, epítopo de TRP2 em CDR H2 e epítopo de HepB CD4 em CDR L1 com região constante de IgG2a murina (DCI853). No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2, péptido auxiliar HepB e controlo. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

D, foram ensaiados esplenócitos de ratinhos imunizados com DCIB15 ou OCIB53 com respeito à avidéz para o epítopo TRP2 medindo respostas a concentração de péptido crescente em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

E, foram imunizados ratinhos transgênicos HLA-DR4 no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody que continham epítipo de gp100DR4 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de gp100DR7 em CDR H3 de IgG1 humana (DCIB54) ou epítipo de gp1 GODR4 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de gp100DR7 em CDR H3 com região constante de IgG2a murina (OCIB64). No dia 19, os esplenócitos foram analisados com ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2, péptido auxiliar gp100DR4 e controlo. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

F, foram ensaiados esplenócitos de ratinhos imunizados com OCIB54 ou DCIB64 com respeito a avidéz para o epítipo de TRP2 medindo respostas a concentração de péptido crescente em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

Figura 54: Sequência de OCIB53

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das cadeias de comprimento completa pesadas e leves murinas dentro do vector de expressão pDCOrig moigG2a. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de GP100210M em H1 (TIMDQVPFSV), o epítipo de TRP2 em H2 (SVYDFFVWL) e o epítipo de HepB CD4 em L1 (TPPAYRPPNAPIL) em L1. Destacam-se os locais de restrição *HindIII*/*Afe I* e *BamHI*/*BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 55: Sequência de DCIB64

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das cadeias de comprimento completa murinas pesadas e leves dentro do vector de expressão pDCOrig moigG2a. O codão de parada é representado por um asterisco. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de gp100 CD4 restringido por HLA-OR7 (GTGRAMLGHTMEVTYH) em H1, o epítipo de TRP2 (SVYDFFVWL) em H2 e o epítipo de gp100 CD4 restringido por HLA-DR4 em H3 (WNRQLYPEWTEAQRDL). Destacam-se os locais de restrição *HindIII*/*Afe I* e *BamHI*/*BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 56: O processamento de imunoproteasoma é importante na geração de respostas de epítipos dentro de construções de ImmunoBody.

Foram imunizados ratinhos HHDII no dia 0, 7 e 14 com construções de ImmunoBody que continham o epítipo de gp100²⁰⁹⁻²¹⁷ em CDR H1 (DCIB41) ou a versão modificada gp100210M em CDR H1 (DCI815). No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido gp100²⁰⁹⁻²¹⁷ ou péptido gp100210M e controlo. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

Figura 57: Diferentes procedimentos de imunização são eficazes na indução de respostas imunes de vacina de ImmunoBody.

A, foram imunizados ratinhos C57BI/6 com ADN de ImmunoBody (OCIB15) por meio de pistola génica, i.m. +/- electroporação ou i.d. +/- electroporação nos dias 0, 7 e 14. No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2, péptido auxiliar HepB e controlo. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

B. Foram ensaiados esplenócitos de ratinhos imunizados por diferentes vias com respeito a avidéz para o epítipo de TRP2 medindo as respostas a concentração crescente de péptido em ensaio de elispot de IFN γ . As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos e a avidéz é designada como a concentração que proporciona 50 % de função efectora máxima.

Figura 58: A imunização com ImmunoBody induz despigmentação de tipo vitiligo e protege contra apresentação de tumores.

A, os ratinhos C57BI/6 imunizados com ADN de ImmunoBody que contém o epítipo de TRP2 em CDR H2 e o epítipo deHepB CD4 em CDR L1 (DCIB18) demonstram despigmentação no crescimento capilar no local de imunização.

B, a ratinhos imunizados C57BI/6 foram desafiados entre a 3^a e 4^a imunizações 2x10⁴ células B16F10 IFN α i.v. Foi avaliada a carga tumoral nos pulmões aos 49 dias depois da apresentação tumoral. A carga tumoral expressa-se como uma área de tumor média como uma percentagem da área pulmonar total. Foram apresentados aos ratinhos imunizados 7 dias depois da imunização final 2x10⁴ células B16F10 IFN α s.c. O tamanho do tumor foi medido a intervalos de 3-4 dias e os ratinhos foram sacrificados uma vez que o crescimento tumoral excedeu o limite máximo permitido.

C, o tamanho do tumor foi avaliado no dia 46 depois da injecção de tumor.

D, sobrevivência.

Figura 59: A imunização com ImmunoBody retarda significativamente o crescimento tumoral.

A, ratinhos C57BI6 foram injectados com 2×10^4 células 816F10 s.c. Quatro dias depois da injeção do tumor os ratinhos foram imunizados com ADN de ImmunoBody DCIB52. Foram realizadas imunizações de repetição nos dias 11 e 18 depois da injeção do tumor. A carga tumoral foi analisada a intervalos de 3-4 dias e os ratinhos foram sacrificados uma vez que o crescimento tumoral excedeu o limite máximo permitido. O volume tumoral ao longo do tempo foi representado.

B, ratinhos C57BI6 foram injectados com 2×10^4 células 816F10 IFN α s.c. Catorze dias depois da injeção do tumor os ratinhos foram imunizados com ADN de ImmunoBody DCIB52. Foram realizadas imunizações repetidas nos dias 21 e 28 depois da injeção do tumor. A carga tumoral foi analisada a intervalos de 3-4 dias e os ratinhos foram sacrificados uma vez que o crescimento tumoral excedeu o limite máximo permitido. O volume tumoral é mostrado no dia 47 depois do implante do tumor.

C, ratinhos C57BI6 foram injectados 2×10^4 células B16F10 s.c e anticorpo anti-CD25 i.p. quando era apropriado. Quatro dias depois da injeção de tumor os ratinhos foram imunizados com ADN de ImmunoBody DCIB52 ou ADN de ImmunoBody de controlo. Foram realizadas imunizações repetidas nos dias 11 e 18 depois da injeção do tumor. A imunização no dia 11 foi combinada com a injeção de anticorpo anti-CTLa-4 i.p. quando foi apropriado. Foi analisada a carga tumoral a intervalos de 3-4 dias e os ratinhos foram sacrificados uma vez que o crescimento tumoral excedeu o limite máximo permitido. O volume tumoral ao longo do tempo foi representado.

Figura 60: Sequência de DGIB68

Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes kappa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig. Os aminoácidos dentro das caixas representam o epítipo de gp100 CD4 restringido por HLA-OR7 (GTGRAMLGHTTMEVTYH) em H1 e L3, os epítipos de TRP2 (SVYDFVWL) em H2 e o epítipo de gp100 CD4 restringido por HLA-DR4 em H3 e L1 (WNRQLYPEWTEAQRDL). Destacam-se

os locais de restrição *HindIII/Afe I* e *BamHI/BsiWI* utilizados na transferência da região variável pesada e leve da construção simples.

Figura 61: Podem ser geradas respostas imunes a partir de construções de ImmunoBody expressas de diferentes cadeias principais de vector.

Foram imunizados ratinhos C57BI/6 no dia 0, 7 e 14 com construções de ADN de ImmunoBody que continham epítipo de gp100DR4 em CDR H1, epítipo de TRP2 em CDR H2 e epítipo de gp100DR7 em CDR H3 de IgG1 humana (DCIB54, B1-3) uma construção equivalente no vector pVax (VaxDCIB54, C1-3). No dia 19, os esplenócitos foram analisados por meio de ensaio de elispot de IFN γ contra péptido TRP2 e controlo. As respostas foram medidas como pontos/milhões de esplenócitos.

EXEMPLOS

Métodos

Geração de vectores de ADN

As regiões variáveis pesadas e leves murinas desimunizadas do clone de SC100 VHd VKb (documento W001/88138) dentro dos vectores pSVgptHuigG1 e pSVhygHuCk (Biovation Ltd) foram amplificadas por meio de PCR. Os produtos de PCR da região V_H e V_L foram clonados *in frame* com as regiões constantes kappa e IgG1 humanas utilizando locais *HindIII/AfeI* e *BamHI/BsiWI* para produzir as construções de cadeia simples pOrigHIB e pOrigLIB (veja-se Figuras 1 e 2). A sequência da cadeia kappa e pesada quimérica de comprimento completa foi confirmada pelo procedimento de terminação de cadeia de dideoxi (Sanger *et al*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1977; 74: 5463-7). mostram-se as sequências proteicas traduzidas e de ADN para a cadeia pesada e leve quimérica nas Figuras 3 e 4 respectivamente. Representam-se as localizações das regiões determinantes de complementaridade (CDR).

Com a excepção da região CDR2 pesada que conserva seis aminoácidos, as CDR das cadeias pesadas e leves foram retiradas completamente e foram permutadas por locais de enzima de restrição únicos. Isto foi conseguido por meio de exame cuidadoso das regiões a cada lado da sequência para uma retirada que permitirá que seja gerado um local de enzima de restrição. Estes locais de

restrição únicos são utilizados para abrir o ADN de modo que possa ser inserido um oligonucleótido que codifique um epítipo antigénico. A maioria das sequências flanqueadoras que são perdidas na geração de local de restrição é substituída por inclusão nos iniciadores de epítopos para assegurar que, durante a tradução, os aminoácidos sejam conservados e que as sequências sejam mantidas *in frame*. O Quadro 1 enumera locais enzimáticos escolhidos e sequências de oligonucleótidos epitópicas para todas as CDR.

As regiões CDR foram retiradas e foram substituídas com locais de restrição únicos por meio de PCR de extensão de sobreposição (*overlap extension*) como é mostrado na Figura 5. Para a região variável pesada, os oligonucleótidos H1, H2 e H3 (veja-se o Quadro 2) foram desenhados para substituir cada uma das três CDR. Cada iniciador específico contém 10-20 pb de sequência em cada lado do local enzimático a incorporar. Utilizadas juntamente com o iniciador reverso geral huHeClonR (veja-se Quadro 2) que se une à região constante de IgG1 humana foram preparadas PCR de primeiro ciclo consistentes em 1 µl do plasmídeo molde pOrigHIB, 2 µl de dNTP (2,5 mM), 5 µl de tampão de taq polimerase 10x, 1 µl de iniciador directo e inverso (25 pmoles), 5 unidades de taq polimerase (New England Biolabs) composto a um volume final de 50 µl com água destilada estéril. As reacções foram submetidas a uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C (hibridação) e 1 minuto a 72 °C (extensão). O ciclo final continha uma extensão de 10 minutos utilizando um reactor cíclico programável Techne PHC-1. De forma similar, para a região variável leve, os oligonucleótidos L1, L2 e L3 foram desenhados para substituir cada uma das três CDR (veja-se Quadro 2). Foram preparadas PCR de primeiro ciclo como foi descrito anteriormente mas com o iniciador reverso huLiClonR (veja-se Quadro 2) que se une à região constante da cadeia kappa humana e o molde porigLIB.

Quadro 1. Lista de enzimas de substituição de CDR e sequências de oligonucleótidos epitópicas

COR	Local de RE	Oligo epitópico
H1	<i>Fsp I</i>	5'NNNNNTGGGTTCG3' 3'NNNNNACCCAAGC5'

COR	Local de RE	Oligo epitópico
H2	<i>Msc I</i>	5'TNNNNNNCGATTCA3' 3'ANNNNNNGCTAAGT5'
H3	<i>Srf I</i>	5'GANNNNNNNTG3' 3'CTNNNNNNNAC5'
L1	<i>Eco RV</i>	5'CTCTTGCNNNNNNNTGGT3' 3'GAGAACGNMNNNNNACCA5'
L2	<i>Ssp I</i>	5'CTACNNNNNNNAG3' 3'GATGNNNNNNNTC5'
L3	<i>Hpa I</i>	5TATTACTGCNNNNNNNTTCGGTGGAGG3' 'ATAATGACGNNNNNNNAAGCCACCTCC5'

N representa sequência de ADN epitópica

O resto das letras representa nucleótidos flanqueadores que necessitam ser incorporados

Foi utilizado depois 1 μ l dos produtos de PCR resultantes numa PCR posterior como um iniciador reverso juntamente com o iniciador directo de CMV preparado como foi descrito anteriormente. O fragmento de ADN amplificado de 450 pb foi clonado directamente no vector de TA TOPO pCR 2,1 (Invitrogen) e os clones foram sequenciados para confirmar a amplificação da região V_H e V_L desprovidas das CDR e substituição de local de restrição.

As CDR dentro da região pesada e leve variável foram substituídas com seu local enzimático correspondente H1, H2, H3, L1, L2 e L3 de forma simples, em combinação e juntas (Figura 6 e 7). As diferentes versões foram inseridas depois em pOrig HIB e pOrigLIB utilizando HindIII/AfeI e BamHI/BsiWI com substituição directa das regiões V_H e V_L de SC100 desimmunizadas de tipo selvagem parentais. Isto permite a geração de moléculas que contêm epítomos simples ou múltiplos (do mesmo ou diferentes antígenos).

Quadro 2 - Iniciadores

Oligonucleótido	Sequência
H1	<i>FspI</i>

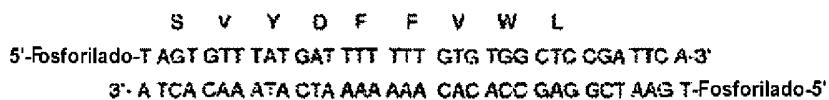
Oligonucleótido	Sequência
	5'-CCT GAG AAT GTC CTG CTG CGC AGG CTC CGG GGA AG-
H2	<i>MscI</i> 5'CAT TGG TAG TGG TGG CCA TTT CCA GAG AC-3'
H3	<i>SrfI</i> 5'CCG TGT ATT ACT GTG CCC GGG CCA AGG AAC CAC GGT C-3'
L1	<i>EcoRV</i> 5'-GGA GCC AGC CTC GAT ATC TGC AGA AAC CAG GC-3'
L2	<i>SspI</i> 5'CCA CAG CTC CTA ATA TTC AGT GGC AGT GGA TC-3'
L3	<i>HpaI</i> 5'-GCT GAG GAT ACC GGA GTT AAC CAA GGT GGA AAT C 3'
huHeCronR	5'CGC CTG AGT TCC ACG ACA CC-3'
huLiClonR	5'-CAG GCA CAC AAC AGA GGC-3'
Directo de CMV	5'-GGC GTG GAT AGC GGT TTG AC-3'
OrigstopphuHeCH 1 Dir	5'-CCA AGG TTG ACA AGA AAG TTT GAC CCA AAT CTT GTG ACA
OrigstopphuHeCH 1 rev	5'-GAG TTT TGT CAC AAGATT TGG GTC AAA CTT TCT TGT CCA OCT TGG-3'
pOrig leve sem líder Dir	5'-AGG ATC CAC CAT GGA TGT GTT GAT GAC CC-3'
pOrig pesado sem líder Dir	5'-AAA GCT TAT GCA GGT GCA GCT GGT G-3'
huigG3rev2	5'-ATC GAT ATC ATT TAC CCG GAG ACA GG-3'
IgG3hutor2	5'-ACT GTC TCC AGC GCT TCC ACC AAG-3'
IgG2 dir	5'-AGT CAC CGT TTC CAG CGC TTC CAC-3'
IgG2 rev	5'-AGT GGA TAT CAT TTA CCC GGA GAC AGG-3'
HIBF	5'-AAC AGT CTG AGG GOT GAG GA 3'
huigG1PVA REV	5'-A GAC TGA CGG TCC CCC CGC GAC TGG AGG TGC TGG-3'
HulgG2ELLGRev	5'-A GAC TGA CGG TCC TCC TAA CAG TTC TGG TGC TGG-3'
Sv40premDIR	5'-A GCT AGC ATC AGC ACG TGT TGA CAA TTA ATC ATC-3'
SV40precnREV	5'-ACC GAT TCC GAA GCC CAA CCT TTC ATA G-3'
migG2aClAfe1F2	5'-TTT ACA GCG CTA AAA CAA CAG CCC CAT CGG TC-3'
migG2aXbaRA	5'-TCT AGA TCA TTT ACC CGG AGT CCG GGA GAA GCT C-3'
MoLC1 BsiF1	5'-TTT CGT ACG GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC-3'
MoLCXhoR1	5'-TTT CTC GAG TCA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GC-3'
MolgG2BamHI Dir	5'-CC TTG ACC TGG AAC TCT GGT TCC CTG TCC AGT GGT G-3'

Oligonucleótido	Sequência
MolgG2BamHI Rev	5'-C ACC ACT GGA CAG GGA ACC AGA GTT CCA GGT CAA GG-3'
MoigG2xhoI Dir	5'-GC AGC TGA GTG ACT GTA ACT TCG AGC ACC TGG CCC AGC-3'
MaigG2XhoI Rev	5'-GCT GGG CCA GGT GCT CGA AGT TAC AGT CAC TGA GCT GC-3'
wtkappavarLldir	5'-C TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC CTG GTA CAT AGT AAT GGA AAC ACC TATTTA GAA TGG T-3'
wtkappavarLlrev	5'A CCA TTC TAA ATA GGT GTT TCC ATT ACT ATG TAC CAG GCT CTG ACT AGA TCT GCA AGA G-3'
Directo de TRP2 murino	5'-TTT CTA AGC TTA TGG GCC TTG TGG GAT GGG GGC TTC-3'
Reverso de TRP2 murino	5'-TTT CTG ATA TCT CAG GCT TCC TCC GTG TAT CTC TTG C-3'
Directo de GP100	5'-TTT CTG ATA TCA TGG GTG TCC AGA GAA GGA GOT TC-3'
Reverso de Gp100	5'-TTT CTC TCG AGA CAG ACC TGC TGT CCA CTG AGG AGC-3'

Inserção de epítomos antigénicos em locais COR de vectores de cadeia simples.

São enumerados vários epítomos de CTL CD8 e auxiliares CD4 no quadro, 3, embora possa ser inserido facilmente qualquer epítomo em qualquer dos locais dentro dos vectores de cadeia simples. Por exemplo, a inserção do epítomo de TRP2 no local H2 do vector pOrigHIB foi conseguida como segue.

Foram desenhados oligonucleótidos complementares para codificar uma sequência de nucleótidos que na tradução expressa o epítomo. A sequência de ADN que codifica o epítomo foi flanqueada pelos nucleótidos de CDR correspondentes para assegurar que, ao traduzir, os aminoácidos se conservassem e que a sequência permanecesse *in frame* (veja-se Quadro 1). Os iniciadores foram enviados para síntese (MWG) e foram fosforilados na extremidade 5'.



Os oligonucleótidos complementares foram ressuspensos a uma concentração final de 1 mg/ml em água duplamente destilada estéril e foram ligados entre si preparando uma reacção com 10 µl de cada iniciador composta a um volume final de 50 µl com tampão TE. A reacção foi submetida a ciclo a 95 °C durante 5 minutos (0,1 °C/segundo), 72 °C durante 20 minutos (0,1 °C/segundo), 55 °C durante 20 minutos e depois foi mantido a 4 °C.

Para inserção no local H2, o vector pOrigH1B H2 e/ou pOrigH1B H1H2 foi linearizado preparando um produto de digestão de restrição com MseI (dependente de CDR para ser utilizado para inserção de epítipo) e foi incubado durante uma noite a 37 °C. O produto de digestão foi submetido a electroforese num gel de agarose 1,5 % e o vector cortado foi purificado por extracção em gel. Para evitar a autoligação do vector linearizado, foram retirados os grupos fosfato das extremidades 5' do vector por tratamento e incubação durante uma noite a 37 °C com fosfatase alcalina intestinal de bezzero (CIAP) 5 unidades, 10 µl de tampão NEB 3 10 x composto a um volume final de 100 µl com água destilada estéril. O vector desfosforilado foi purificado e foram preparadas ligações com diluições puras, 1/100 e 1/200 dos oligonucleótidos anelados para terminar directamente no local H2 utilizando técnicas convencionais. As inserções de epítipos foram confirmadas sequenciando dentro dos vectores simples utilizando o iniciador universal de CMV directo.

Quadro 3 Epítomos auxiliares e de CTL

PROTEÍNA	COORDENADAS	SEQUÊNCIA	RESTRIÇÃO POR HLA
TRP2	180-188	SVYDFFVWL agtgtttatgattttttgtgtggctc	A2, Kb
GP100	209-217	ITDQVPFSV accattactgaccggcgcctttctccgtg	A2
GP100 (210M)	209-217(M)	IMDQVPFSV accattatggaccaggtgcctttctccgtg	A2
GP100 (F7L)	209-217	ITDQVPLSV accattactgaccaggtgcctttgtccgtg	A2
GP100	44-59	WNRQLYPEWTEAQRDL tggaacaggcacctgtatccagagtggaacagaaocccagagacttoac	DR0401
HEPB S AG	28-39	IPQSLDSWWTSL ataccgcagagtctagactcgtggtggacttctctc	Ld (CTL)
Nucleoproteína HepB	128-140	TPPAYRPPNAPIL actcctccagcttatagaccacaaalaccctatccta	I-Ab (auxiliar)
MAGE3	271-279	FLWGPRALV ttcctgtggggtccaaggccctcgtt	A2
Tie2 (Z83)	124-132	FLPATLTMT ttcctaccagctaactttaactatgact	A2
Tie2 (ZB4)	124-132	FLPATLTMV ttcctaccaactactttaactatgggt	A2
Tre2 (Z9)	431-439	GMVEKPFNI	A2

PROTEÍNA	COORDENADAS	SEQUÊNCIA	RESTRIÇÃO POR HLA
		gggatggtggaaaagcccttcaacatt	
Tie2 (mZ9)	431-439	GMVEKPFNV ggatggtggaaaagcccttcaacgtt	A2
FLU HA	111-120	FERFEIFPKE tttgaaaggtttgagatattccccaaggaa	I-Ad (auxiliar)
ovoalbumina	258-265	SIINFEKL agtataatcaactttgaaaaacta	Kb
Triosafosfato isomerase (wt)	23-37	GELIGTLNAAKVPAD ggggagctcatcggcattctgaacgcggccaaggtgccggccgac	DR0101
Triosafosfato isomerase (m1)	23-37	GELIGILNAAKVPAD ggggagctcatcggcactctvaacgcggccaaggtgccggccgac	DR0101
VEGFR2	773-781	VIAMFFWLL gtgattoccatgttcttctggclactt	A2
mVEGFH2	773-781	VLAMFFWLL gtgcttaccatggttcttctggctactt	A2

Transferência ao vector de expressão duplo pDCOrig

Uma vez que foram incorporados todos os epítomos nos locais V_H e V_L dentro dos vectores simples, são transferidos ao vector de expressão duplo pDCOrig utilizando *HindIII/AfeI* e *BamHI/BsiWI* *in frame* com suas regiões constantes humanas respectivas. Para gerar o vector de expressão de ImmunoBody™ pDCOrig, foi linearizado pOrigHIB utilizando a endonuclease de restrição de extremidades cegas *NruI* localizada adjacente ao promotor de CMV. pOrigLIB foi digerido com as endonucleasas de extremidades cegas *NruI* e *HpaI* para escisar o cassete de expressão de cadeia leve completo que consiste no promotor de CMV, cadeia kappa humana desimunizada e o sinal de poli A de BGH. Depois de electroforese em gel, isolamento e extracção em gel do vector linearizado pOrigHIB e do cassete de expressão de cadeia leve o vector foi desfosforilado e o cassete de expressão de cadeia leve foi ligado para formar a construção pDCOrig (Figura 8). A orientação do cassete de cadeia leve dentro de pDCOrig foi confirmada por análise de restrição.

pDCOrig contém as sequências codificantes o gene tanto de cadeia leve como de cadeia pesada combinadas dentro da mesma construção, eliminando sequências intrónicas e o sistema de dois vectores. A expressão é dirigida pelos promotores precoces imediatos de CMV de alto nível e outros elementos de controlo de ADN, tais como sinal de poliadenilação de hormona de crescimento bovina. O marcador de selecção zeocina também foi incluído para maximizar a expressão e eficácia de produção. O desenho cuidadoso deste vector conservou os locais de enzimas de restrição únicos nos pontos de união das regiões variáveis e constantes e proporciona um método fácil e rápido para criar diferentes combinações das regiões variáveis (inserções de epítomos, veja-se a Figura 8). O quadro 4 enumera algumas das construções de pDcOrig IB geradas.

Quadro 4. Construções de pDCOrig

	H1	H2	H3	L1	L3
DCIB15	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
DCIB17	Gp100 210M TIMDOVPFSV			Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
DCIB18		TRP2 SVYDFFVWL		Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
DCIB21		Ag S de HepB IPOSLSWWTSL		Fiu HA FERFEIFPKE	
OCIB24		OVOALBUMINA SHNFEKL		Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
DCIB25	Gp100 210M TMDOVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL			Nucleoproteína HepBTPPAYRPPNAPIL
DCIB26	Tie-2 Z54 FLPATLTMV			Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
DCIB30	Gp100 F7L TITDCVPLSV	TRF2 SVYDFFVWL		Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
DCIB31			TRP2 SVYDFFVWL		
DCIB32			TRP2 SVYDFFVWL		Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL
DCIB33 huigG2	Gp100 F7L TITDCVPLSV	TRP2 SVYDFFVWL		Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	

	H1	H2	H3	L1	L3
DCIB35	Gp100 210M TMDVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		Gp100 WNROLYPEWTEAQPLD	
DCIB36					TRP2 SVYDFFVWL
DCIB37	Gp100 F7L TITDOVFLSV			Nucleoproteína Hep9 TPPAYRPPNAPIL	
DCIB40	Gp100 F7I TITDOVFISV			Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
DCIB41	Gp100 wt TITCOVPFSV			Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
DCIB42	Gp100 F7Y TITDOVPYSV			Nucleoproteína HepB TPPAYRPPHAPIL	
DCIB43	Gp100 V5L TITDOLPFSV			Nucleoproteína HspB TPPAYRPFNAPIL	
DCIB48		TRP2 GVDFFVWL	Gp100 WNROLYFEWTEAQRLD		
DCIB49			Nucleoproteína HepB TPPAVRPPNAPIL		
DCIB50	Gp100 210M TIMDOVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL			Gp100 WNROLYPEW TEACALD
DCIB52		TRP2 SVYDFFVWL	Nucleoproteína HepB TPPAVRPPNAPIL		

	H1	H2	H3	L1	L3
DCIB53 MoigG2a	Gp100 210M TIMCOVFFSV	TRP2 SVYDFFVWL		Nucleoproteína HepB TPPAVRPPNAPIL	
DCIB54	Gp100 GTGRAMLGTHMEVTVYH	TRF2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRDL		
DCIB64 MoigG2a	Gp100 GTGRAMLGFTMTMEVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL			
CIB65 huigG3	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
Motivo huig G1 + G2 de DCIB66	Gp100 210M TIMDOVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		Nucleoproteína HepB TPPAYRFPNAPIL	
Motivo huig G2 + G1 de DCIB87	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	
DCIB68	Gp100 GTGRAMLGTHEM EVITVYH	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRDL	Gp100 WNRQLYPEWTEACRLD	Gp100 GTGRAMLGHTM EVIVYH
DCIB69 MoigG2a	Gp100 GTGRAMLGHTM EVTVYR	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRDL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRDL	Gp100 GTGRAMLGHTM EVTVVH
OCIB71	Tie-2 Z12 ILINSLPLV			Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	

	H1	H2	H3	L1	L3
DCIB72		Tie-2 Z12 ILINSLPLV		Nucleoproteína HepB TPPAYRPPNAPIL	

Geração de pDcOrig IB15 CH1 stop

É incorporado um codão de parada depois do domínio CH1 da região constante de IgG1 humana dentro da construção pOCOrig IB15 utilizando o kit de mutagénese dirigida Quik change (Stratagene) e os iniciadores oligonucleotídicos complementares directo origstopHuHeCH1 e inverso OrigstopHuHeCH1 (veja-se Quadro 2) como é indicado pelo fabricante. A incorporação de codão de parada é confirmada por sequenciamento de ADN (Figura 9).

Retirada de sequências líder de pDCOrig IB15

Para retirar a sequência líder da cadeia pesada e leve do vector pDCOrig IB15, foram preparadas PCR utilizando o molde pDCOrig IB15 com os iniciadores directos leve pOrig sem líder e pesado pOrig sem líder juntamente com os iniciadores inversos huHeClonR e hiLiClonR respectivamente (Quadro 2). Os fragmentos amplificados foram ligados com TA TOPO no vector pCR 2,1 (Invitrogen) e os clones foram confirmados por sequenciamento. As regiões de IB15 tanto V_H como V_L desprovidas de líder foram clonadas de novo em pDCOrig IB15 utilizando locais HindIII/AfeI e BamHI/BsiWI respectivamente. A sequência de ADN e tradução para as regiões V_H e V_L se mostram nas Figuras 10 e 11 respectivamente.

Construção de isotipos IgG2 e IgG3 humanos do vector de expressão duplo Immunobody™ pDCOrig

A região constante de IgG3 humana foi amplificada por meio de PCR utilizando os iniciadores directo e inverso huigg3 (Quadro 2) incorporando um AfeI e EcoRV respectivamente com o molde pOTB7huigg3 (clone de imagem 4566267 MGC 45809). De forma similar a região constante de IgG2 humana foi amplificada utilizando iniciadores IgG2Dir e IgG2Rev (Quadro 2) com o molde pTOB7 huigg2 (clone de imagem 6281452 MGC 71314).

Ambos fragmentos foram ligados com TOPO em pCR 2,1 e a sequência foi confirmada (Figuras 12 e 13). A região constante huigG1 dentro da construção pDCOrigIB15 foi substituída eficazmente com tanto huigG2 como huigG3 clonados *in frame* com a variável pesada utilizando locais Atel e SapI para gerar pDCOrigIB15 huigG2 e pDCOrigIB15 huigG3 (Figura 14). Ambos os vectores conservam os mesmos locais de restrição únicos no ponto de união da região variável/constante. Isto permite uma permuta fácil de regiões variáveis entre todos os vectores de Immunobody de cadeia dupla e simples de isotipo humano.

Mutação de IgG1 Fcy humano e domínio de união a Receptor de IgG2 humana

Para substituir os aminoácidos E233 L234 L235 do motivo de união huigG1 dentro do domínio CH2 com P233 V234 A235 de huigG2, uma secção curta foi amplificada de novo por meio de PCR incorporando a mutação. Foi utilizado o iniciador reverso huigG1 PVA Inv que continha as substituições e o local de restrição constitutivo AhdI com o iniciador directo HIBF (Quadro 2) e o molde pDCOrig IB15. O fragmento resultante foi ligado no vector pCR 2,1 (Invitrogen). Depois de confirmação de sequência, a sequência de tipo selvagem foi substituída eficazmente com a secção que continha as mutações pela inserção de nos locais de corte simples AgeI/AhdI do plasmídeo pDCOrig IB15 huigG1 (Figura 15).

Os aminoácidos P233 V234 A235 dentro do domínio constante de huigG2 da construção pDCOrig IB15 huigG2 também foram substituídos com o motivo de união a huigG1 ELLG. Como antes, foi utilizado o iniciador reverso huigG2ELLGInv (Quadro 2) que continha as substituições e o local de restrição constitutivo AhdI com o iniciador directo HIBF e a IgG2 humana do molde pDCOrig IB15. O fragmento foi ligado com TA TOPO no vector pCR 2,1. Depois

de confirmação de sequência, a sequência de tipo selvagem foi substituída de novo com a secção que continha o motivo de união a huigG1 utilizando locais Agel/AhdI do plasmídeo pDCOrig IB15 huigG2 (Figura 16).

Geração de plasmídeos de IgG2a murinos de pDCOrig DCIB53 e DCIB63

Para construir uma versão de IgG2a murina do vector de duplo expressão pDCOrig, foi sintetizado ADNc de ARN total isolado da linha celular de hibridoma 337. Para amplificação da região constante de IgG2a murina, foi utilizado o iniciador directo migG2aC1 AfeF2 que continha local de restrição AfeI juntamente com o iniciador reverso migG2aXbaRA que albergava um local XbaI depois do codão de parada. O fragmento de PCR foi ligado com TOPO no vector PCR 2,1. Depois de conformação de sequência, a região constante de IgG2a murina foi excisada e foi clonada *in frame* com a região variável pesada murina nos locais AfeI/XbaI do vector pOrigHIB substituindo eficazmente IgG1 humana. Foi retirado um local BamHI e XhoI sem alterar, na tradução, a sequência de aminoácidos da região constante de IgG2a murina, sequencialmente por mutagénese dirigida utilizando kit de mutagénese dirigida Quik change (Stratagene) e os iniciadores complementares MoigG2BamHIDIR e REV, MoigG2XhoIDIR e REV respectivamente. Isto gerou o vector de ImmunoBody de cadeia simples pMoOrigHIB (Figura 17A). Uma secção de pMoOrigHIB que continha a região constante de McigG2a da construção simples foi transferida ao vector de duplo expressão pDCOrig IB15 *in frame* com a região variável pesada murina utilizando AfeI e AvrII de corte simples localizados no promotor de SV40 para gerar o vector intermediário pDCOrigIB15MoigG2a hukappa que ainda continha uma região kappa humana.

Para amplificação da região kappa murina, foi utilizado o ADNc como um molde com os iniciadores

MoLC1BslF1 que continha um local BsiWI e MoLCXhoI incorporando um local XhoI depois do codão de parada. O fragmento amplificado foi clonado por TOPO no vector pCR 2,1 como antes. A região kappa murina foi excisada e foi ligada no vector de ImmunoBody pOrigLIB L1 e pOrigLIB hepB auxiliar hepB/L1 substituindo a constante kappa humana utilizando BsiWI/XhoI gerando o vector intermediário pMoLIBL1Bsi e pMoLIB HepB auxiliar hepB/L1 Bsi. O sistema de Immunobody implica a transferência de regiões variáveis utilizando um local de restrição único no ponto de união das regiões variáveis e constantes enquanto que o ponto de união entre a variável pesada murina e a constante moigG2a podem acomodar um local AfeI (presente dentro de todos os vectores de Immunobody humanos) e não alterar a sequência de aminoácidos na tradução, a região entre a kappa e variável murina é problemática. Na análise de sequência neste ponto de união não se poderia incorporar local de restrição único que não alterasse a sequência de aminoácidos. O local BsiWI no ponto de união foi retirado para voltar à sequência de tipo selvagem. Isto foi conseguido amplificando a cadeia de comprimento completa murina inteira por meio de PCR sobreposta. Foi preparado uma primeira PCR utilizando o iniciador directo MoKappaSDMdir que continha sequência de tipo selvagem no ponto de união e região flanqueante retirando eficazmente BsiWI, o iniciador reverso BGH e os vectores de cadeia leve intermediários pMoLIBL1 Bsi e pMoLIB hepB auxiliar hepB/L1 Bsi como molde respectivamente. Foi utilizado um fragmento amplificado de aproximadamente 430 pb do primeiro ciclo de PCR como um iniciador reverso contendo o iniciador directo Immuno-LikozDir um local BamHI. As cadeias kappa murinas de comprimento completa amplificadas foram ligados por TOPO em pCR 2,1 e foi confirmada sua sequência. A cadeia kappa murina de comprimento completa que continha ajuda de hepB

no local de L1 em pCR 2,1 foi excisada e foi clonada nos locais BamHI/XhoI do vector de expressão duplo intermediário pCCCrIGIB15MoigG2a hukappa substituindo a cadeia kappa humana para gerar o vector de expressão duplo murino pDCOrigIB GP100210m/H1 TRP2/H2 HepB auxiliar/L1 molgG2a (DCIB 53, Figura 17 B e 54).

De forma similar, a cadeia kappa murina de comprimento completa que continha um local L1 foi excisada e foi clonada nos locais BamHI/XhoI do vector de expressão duplo intermediário pDCOrigIB15MoigG2a hukappa substituindo a cadeia kappa humana para gerar o vector de expressão duplo murino intermediário pDCOrigIB15molgG2a com um local L1 vácuo. Para gerar a construção com uma região variável leve de tipo selvagem, os iniciadores fosforilados 5' complementares wtkappavarL1 dir e rev (Quadro 2) foram hibridados e inseridos no local L1 depois de linearização com EcoRV como foi descrito anteriormente. Finalmente a região variável pesada de DCIB 54 que continha GP100DR7/H14 TRP2/H2 e GP100DR4/H3 foi transferida utilizando HindIII/AfeI para gerar pDCOrigGP100DR7/H1TRP2/H2GP100DR4/H3moigG2a kappa de tipo selvagem (DCIB68 Figura 17C e 60).

Retirada do promotor de SV40 eucariota do vector de expressão duplo de Immunobody pDCOrig para requisitos de vacina de ADN reguladora

O promotor bacteriano EM7 e gene de zeocina foram amplificados utilizando o iniciador directo SV40PremDIR incorporando um local NheI e iniciador reverso SV40remINV (Quadro 2) com o molde pOrigHIB. O fragmento de PCR de 511 pb resultante foi ligado por TOPO em pCR 2,1 e foi confirmada por sequenciamento. O promotor EM7 e uma secção do gene de zeocina foram excisados utilizando NheI e FseI de pCR 2,1 e foram clonados directamente em pOrigHIB H1 retirando eficazmente o promotor de SV40. O local NheI

reside antes do promotor de SV40 enquanto que na sequência de reconhecimento de FseI é um cortador simples dentro do gene de zeocina do vector. Depois de confirmação de sequência uma secção maior do vector simples foi transferida ao vector pDCOrig IB68 que codifica a extremidade de cauda de huIgG1, poliA de BGH, EM7 e parte do gene de zeocina digerindo com SapI e FreI retirando eficazmente o promotor de SV40 do vector de expressão duplo.

Alteração da cadeia principal de pDCOrig para uma pVax1 (Invitrogen) compatível com a regulação da FDA

A cadeia pesada de IgG1 humana de comprimento completa de Immunobody foi excisada da construção DCIB54 utilizando HindIII e XbaI e foi inserida nestes locais dentro do MCS do vector pVax1 (Figura 18 A). Para gerar a versão pVax do vector de expressão de duplo cadeia, pVaxIB54HIB foi linearizado utilizando a endonuclease de restrição de extremidade romo NruI localizada adjacente ao promotor de CMV. pOrigLIB (Figura 18 B), foi digerida com as endonucleases NruI e HpaI de extremidades cegas para excisar o cassete de expressão de cadeia leve completo consistente no promotor de CMV, cadeia kappa humana de Immunobody e a sinal poliA de BGH. Depois de electroforese em gel, isolamento e extracção de gel do vector linearizado pVaxIB54HIB e o cassete de expressão de cadeia leve o vector foi desfosforilado e o cassete de expressão de cadeia leve foi ligado para formar a construção pVaxDCIB54 (Figura 18C). A orientação do cassete de cadeia leve dentro de pVaxDCIB54 foi confirmada por meio de análise de restrição. pVaxOCIB54 conserva os mesmos locais de restrição únicos no ponto de união de região constante/variável permitindo a permuta fácil de regiões variáveis entre todos os vectores de Immunobody de cadeia duplo e simples de isotipo humano. Por exemplo para gerar

pVaxDCIB68 (Figura 60) a região variável leve murina que continha Gp100DR4/L1 e Gp100D37/L3 foi excisada de DCIB68 utilizando BamHI/BsiWI e foi clonada em pVaxDCIB54 substituindo eficazmente a região variável de tipo selvagem leve.

Geração de TRP2 murino de pOrig e GP100 de pCDNA3

Para construir TRP2 murino de pOrig, foi utilizado ADNc sintetizado de 5 µg de ARN total isolado da linha celular B16F10 como um molde para a amplificação de proteína relacionada com tirosinase 2 (TRP2) murina de comprimento completa utilizando os iniciadores murinos de TRP2 directo e inverso (Quadro 2) com incorporação de um local HindIII ou EcoRV respectivamente. Foi ligado TRP2 de comprimento completa no local de clonagem múltiple HindIII/EcoRV do vector pOrigHIB. Também se amplificó GP100 murino de comprimento completa do ADNc utilizando os iniciadores murinos de GP100 desenhados directo e inverso que continham locais EcoRV e XhoI respectivamente. (Quadro 1). O produto de PCR foi clonada nos locais EcoRV/XhoI do vector de expressão de mamíferos pCDNA3 (Invitrogen). Ambos plasmídeos foram identificados por análise de restrição e foram confirmados por sequenciamento de ADN.

ELISA de tipo sanduíche

Foram revestidas placas flexíveis de 96 poços Falcon, durante a noite a 4 °C, com 50 µl de anticorpo específico anti-Fc de IgG humana (Sigma 12136) ou anticorpo de anti-cadeia leve kappa humana (Dako A0191) a 10 µg/ml em PBS. As placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20 (0,05 %) 200 µl/poço, utilizando um Skan Washer 400 (Molecular Devices), e os poços foram bloqueados com gelatina de pele de peixe a 1 % (Sigma) em PBS (FSG/PBS 1 %). As placas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente e foram lavadas com FSG/PBS 1 %. O sobrenadante de cultivo de tecido que continha Immunobody expresso ou proteína de

Immunobody purificada (50 μ l) foi adicionado aos poços, em triplicata, e as placas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com FSG/PBS a 1 % e Immunobody foi detectado unido adicionando 50 μ l/poço de anticorpo específico anti-Fc de IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma A0170) ou anticorpo anti-cadeia leve kappa humana (Sigma A7164), diluído 1/2000 em FSG/PBS a 1 %, e foi incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com FSG/PBS 1 % e foram desenvolvidas adicionando substrato TMB (R&D Systems) a 50 μ l/poço. A absorvância foi medida a 650 nm num leitor de microplacas VERSA max (Molecular Devices).

Ratinhos e imunizações

O trabalho com os animais foi levado a cabo sob uma licença de projecto aprovada pelo Ministério do Interior. Foram utilizados machos e fêmeas transgénicos HLA-A2 (HHDII) ou C57BI/6 (Harian) (Instituto Pasteur, Paris) entre 6 e 12 semanas de idade. Péptidos sintéticos foram emulsificados (fabricados por John Keyte, Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de Nottingham, Reino Unido) com adjuvante incompleto de Freund e foram injectados por uma via subcutânea. Cada ratinho recebeu 10 μ g de péptido/imunização. Partículas de ouro de 1,0 μ m foram revestidas com ADN (BioRad, Homel Hempstead, Reino Unido) utilizando as instruções do fabricante e foram administradas por via intradérmica pela pistola génica Helios (BioRad). Cada ratinho recebeu 1 μ g de ADN/imunização. Também foi administrada solução de ADN desnudo i.d. ou i.m. (10 μ g/imunização) combinada imediatamente depois da injeção com um pulso eléctrico curto. Os ratinhos foram imunizados a 0, 1 e 2 semanas e os baços foram retirados na semana 3. O esgotamento do subconjunto de linfócitos T *in vivo* foi realizado por injeção de 400 μ g de anticorpo anti-CD25 (PCR61) i.p.

quatro dias antes da imunização ou 200 μg de anticorpo anti-CTLa-4 i.p. simultaneamente com a imunização secundária.

Reestimulações *in vitro*

Cinco dias depois da imunização final, esplenócitos ($5 \times 10^6/\text{ml}$) foram cocultivados a 37°C com blastos com lipopolissacáridos (LPS) pulsados com péptidos singénicos irradiados (20 Gy) ($0,5$ a 1×10^6 células/ml) em 2 ml de RPMI-1644 com FBS a 10 %, glutamina 2 mM, tampão HEPES 20 M, penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina $100 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ e 2-mercaptoetanol 10^{-5} M em placas de 24 poços. Os blastos com LPS foram obtidos activando esplenócitos ($1,5 \times 10^5$ células/ml) com LPS $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma) e dextrano sulfato $7 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Pharmacia, Mitton Keynes, Reino Unido) durante 3 dias a 37°C . Antes de utilização, foram cultivados 2×10^7 blastos de LPS com péptido sintético $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1 hora. Os cultivos foram ensaiados com respeito a actividade citotóxica no dia 6 num ensaio de libertação de ^{51}Cr .

Ensaio de libertação de ^{51}Cr

As células alvo foram marcadas durante 1 hora com cromato (^{51}Cr) de sódio 1,85 MBq (Amersham, Essex, Reino Unido) com ou sem péptido $100 \mu\text{g}/\text{ml}$. Depois da incubação foram lavadas 3 vezes em RPMI e foram incubadas durante 1 hora adicional com péptido $100 \mu\text{g}/\text{ml}$. Foram preparados 5×10^3 alvos/poço de placas de fundo em V de 96 poços e foram coincubados com diferentes densidades de células efectoras num volume final de $200 \mu\text{l}$. Depois de 4 horas a 37°C , foram retirados $50 \mu\text{l}$ dos sobrenadantes de cada poço e foram transferidos a uma Lumaplate (Packard, Rigaweg, Países Baixos). As placas foram lidas num Contador de cintilação de Microplaca Topcount (Packard). A percentagem de lise específica foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

Lise específica = $100 \times [(\text{libertação experimental} - \text{libertação espontânea}) / (\text{libertação máxima} - \text{libertação espontânea})]$

Ensaio de Elispot ex vivo

Foram realizados ensaios de elispot utilizando reagentes de captura e detecção de IFN γ murino de acordo com as instruções do fabricante (Mabtech, Suecia). Brevemente, poços da placa de Inmobilina P de 96 poços foram revestidos com anticorpos anti-IFN γ e poços repetidos foram semeados com 5×10^5 esplenócitos. Péptidos sintéticos (a uma diversidade de concentrações) ou 5×10^4 células de melanoma alvo foram adicionados a estes poços e foram incubados durante 40 horas a 37 °C. Depois da incubação, o IFN γ capturado foi detectado por meio de um anticorpo anti-IFN γ biotinilado e desenvolvimento com uma fosfatase alcalina de estreptavidina e substrato cromogénico. Os pontos foram analisados e foram contados utilizando um leitor de placa automático (CTL). A avidéz funcional foi calculada como a concentração que media 50 % da função efectora máxima utilizando um gráfico de função efectora contra concentração de péptido. O esgotamento de linfócitos CD8 de populações de esplenócitos foi realizado utilizando Dynabeads CD* (Dyna) de acordo com as instruções do fabricante e depois foram adicionados a ensaio de elispot ex vivo.

Ensaio de tumor

Foram seleccionados aleatoriamente ratinhos C57BI/6 em grupos de tratamento e foram imunizados a intervalos semanais durante cinco semanas. Entre a terceira e quarta imunização foram desafiados por injeção i.v. na veia da cauda 1×10^4 células de melanoma B16F10 IFN α . Quando são injectadas i.v., as células B16F10 migram aos pulmões para formar metástase. Os ratinhos foram monitorizados com respeito a sinais de crescimento tumoral e dor. No dia 49

depois da apresentação de tumor, os ratinhos foram sacrificados e os pulmões foram analisados com respeito à presença de metástase. Os baços foram analisados com respeito à presença de epítopo e respostas imunes específicas de tumor em ensaio de elispot *ex vivo*.

Foram imunizados ratinhos HHDII a intervalos semanais durante três semanas e 7 dias depois da imunização final foram aplicados s.c. no flanco direito 2×10^4 células de melanoma B16F10 HHD. O crescimento tumoral foi controlado a intervalos de 3-4 dias e o tamanho do tumor foi medido utilizando um calibrador.

Exemplo 1 - Construções de ImmunoBody produzem baixos níveis de anticorpo intacto

Prepararam-se transfectantes de células CHO-S estáveis com uma construção de ImmunoBody que continha o epítopo de gp100 IMDQVPFSV e o epítopo de TRP2 SVYDFFVWL em CDR H1 e CDR H2 respectivamente com o epítopo de HepB CD4 TPPAYRPPNAPIL em CDR L1 (DCIB15; Figura 19).

O sobrenadante destes transfectantes foi analisado em relação a expressão de proteína de ImmunoBody por ELISA de tipo sandwich. Foram revestidas placas com anticorpo específico anti Fc de IgG humana e adicionou-se sobrenadante. Detectou-se ImmunoBody unido utilizando um anticorpo de HRP específico anti Fc humano para detectar cadeia pesada. A cadeia pesada detectou-se no sobrenadante a uma concentração de aproximadamente $1 \mu\text{g/ml}$ em comparação com o controlo (Figura 20a). Purificou-se ImmunoBody do sobrenadante utilizando uma coluna de afinidade de proteína A e analisou-se em relação à presença de ImmunoBody. A purificação de ImmunoBody produziu quantidades muito mais baixas de proteína do que se esperava previamente em comparação com o controlo (Figura 20b). Já que tais rendimentos baixos de proteína intacta podiam purificar-se, as construções de ImmunoBody foram analisadas em relação à

expressão de tanto cadeia pesada como anticorpo intacto no sobrenadante de células transfectadas por ELISA de tipo sandwich. As construções com o epítopo de HepB CD4 em CDR L1 e o epítopo de SIINFEKL em CDR H2 (GCIB24; Figura 21) ou o epítopo de gp100 IMDQVPFSV e o epítopo de TRP2 SVYDFFVWL em CDRH1 e CDRH2 respectivamente com o epítopo de HepB CD4 TPPAYRPPNAPIL em CDR L3 (DCIB25; Figura 22) também foram ensaiadas. As placas foram revestidas com anticorpo específico anti Fc de IgG humana e adicionou-se o sobrenadante. O ImmunoBody unido detectou-se utilizando um anticorpo de HRP específico anti Fc humano para detectar cadeia pesada ou um anticorpo de HRP específico de anti cadeia capa humana para detectar ImmunoBody intacto. Os transfectantes de ImmunoBody mostram alto nível de secreção de cadeia pesada, mas muito baixos níveis de ImmunoBody intacto (Figura 20c e d).

Estes dados indicam que a incorporação de epítopos de linfócitos T CD8 e CD4 nas regiões variáveis de cadeia pesada e leve quebrou a estrutura global do ImmunoBody evitando a formação de anticorpo intacto.

Os dados adicionais sobre a análise de sobrenadante de células CHO-S transfectadas demonstram que somente as construções com epítopos de CTL incorporados na CDRH3 ou CDRL3 são secretadas como anticorpo intacto (Figura 20e). Ao contrário, a incorporação de qualquer epítopo dentro da CDRH1 ou CDRH2 permitiu a secreção de quantidades pesadas, mas baixas de anticorpo intacto inclusive se não se incorporava nada dentro da cadeia leve se secretava. A incorporação de qualquer epítopo dentro de CDRL1 de qualquer das cadeias leves tinha como resultado a secreção de nível baixo de cadeia leve inclusive se somente havia um epítopo incorporado na CDRH3 da cadeia pesada.

Exemplo 2 - Epítomos de CTL incorporados na armação de ImmunoBody são processados e apresentados para induzir uma resposta imune *in vivo*

O epítipo de CTL anteriormente publicado de TRP2, aa280-288 (Bloom *et al*, The Journal of Experimental Medicine 1997; 185: 453-9), obteve-se por engenharia genética na região CDR H2 da construção de ImmunoBody junto com um epítipo de CD4 universal de Hepatite B em CDR L1 (DCIB18; Figura 30). Os ratinhos C57BI/6 foram imunizados três vezes a intervalos semanais por via intradérmica com ADN de ImmunoBody por meio do bombardeamento de partículas. Os esplenócitos foram analisados posteriormente por elispot de IFN γ em relação a respostas específicas de TRP2. Os ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody demonstraram respostas específicas de péptido de TRP2 consideráveis em comparação com o controlo, mas respostas de nível mais baixo específicas para o péptido de HepB CD4 (Figura 31a). A avidéz das respostas específicas de TRP2 também foi estudada por titulação de péptido em elispot de IFN γ . Nos quinze ratinhos ensaiados dentro de cinco experiências diferentes, a avidéz das respostas varia de 10^{-9} M a 10^{-11} M de péptido. Mostra-se um exemplo representativo na Figura 31 b.

Com a finalidade de confirmar que esta resposta específica de TRP2 estava mediada por linfócitos T CD8, os ratinhos C57BI/6 foram imunizados três vezes com ADN de ImmunoBody a intervalos semanais. Seis dias depois da última imunização os esplenócitos foram isolados e analisados *in vitro* em relação a respostas específicas por elispot de IFN γ . Para determinar se a resposta específica de TRP2 estava mediada por linfócitos T CD8, suprimiram-se os linfócitos T CD8 antes da análise no ensaio de elispot. A supressão de linfócitos T CD8 conduziu à supressão da resposta específica de TRP2; no entanto, o esgotamento de

CD8 não afectou à resposta de péptido HepB CD4, o que sugere que está mediada mais provavelmente por linfócitos T CD4 (Figura 31 c).

Para determinar se as respostas geradas por imunização com ADN de ImmunoBody são capazes de matar as células alvo *in vitro*, os esplenócitos foram estimulados com blastos de LPS pulsados com péptido TRP2 *in vitro* durante 6 dias e foram analisados num ensaio de libertação de cromo contra células de melanoma B16F10. Os esplenócitos de ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody demonstraram lise superior tanto de células B16F10, que têm baixos níveis de MHC de classe I na superfície, como de células B16F10 IFN α , que têm alta expressão de MHC de classe I na superfície em comparação com a da linha B16F10 que não expressa moléculas H-2Kb (B16F10 siKb). A supressão da morte frente à linha celular B16F10 siKb demonstra que a morte depende de CD8 e está restringida através de H-2Kb (Figura 31d).

Estes resultados mostram que o epítipo de TRP2 (SVYDFFVWL) CD8 incorporado na região CDR H2 da armação de ImmunoBody é processado e apresentado para induzir respostas de alta frequência mediadas por meio de MHC de classe I. O epítipo de HepB CD4 também é processado e apresentado no contexto de MHC de classe II para induzir boas respostas mediadas por CD4 de imunização com ADN.

As respostas específicas de epítipo de TRP2 também foram analisadas de outras construções que contêm epítipo de TRP2 utilizando metodologia idêntica. A incorporação do epítipo de TRP2 em CDR dentro da cadeia pesada tinha como resultado respostas específicas de péptido de alta frequência (Figura 31e). Ao contrário, a incorporação de epítopos de CTL dentro da cadeia leve tinha como resultado uma redução significativa da frequência de CTL (DCIB36). A análise da avidéz das respostas específicas de epítipo de TRP2 revela que são de alta avidéz quando se geram a partir

de epítomos dentro da cadeia pesada, mas esta é consideravelmente menor com a expressão de epítomos da cadeia leve (Figura 31f). Observaram-se respostas auxiliares de alta avidéz de alta frequência para todas as construções (Figura 31 g), o que sugere que a secreção de cadeia pesada era uma vantagem para estimular respostas de CTL, mas não para respostas auxiliares.

Exemplo 3 - A imunização de ADN de ImmunoBody é melhor que a imunização com péptido ou imunização com antigénio completo

Para analisar a eficácia de imunização de ADN de ImmunoBody, comparou-se com imunização s.c. com epítomo peptídico em adjuvante incompleto de Freund ou imunização com um ADN que expressa o antigénio de TRP2.

Os ratinhos C57BI/6 receberam três imunizações semanais com ADN ou péptido que compreendia o epítomo de TRP2 ligado ao epítomo auxiliar universal em IFA. As respostas específicas de péptido auxiliar e TRP2 geradas em ratinhos imunizados com ImmunoBody foram muito superiores em magnitude às induzidas por imunização com péptido ou imunização com o antigénio de TRP2 completo (Figura 32a). A análise adicional da avidéz destas respostas específicas de péptido revelaram que as respostas geradas por ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody têm uma avidéz mais de um logarítmico maior que as de indivíduos imunizados com péptido (Figura 32b). As respostas geradas em ratinhos C57BI/6 foram analisadas posteriormente em relação à capacidade citotóxica *in vitro* frente à linha celular B16F10 e, como um controlo negativo, a linha celular B16F10 siKb. A Figura 32c mostra que os ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody são capazes de actividade tumoral *in vitro* que está restringida por H-2Kb e tanto os ratinhos imunizados com péptido como os ratinhos imunizados com

antigénios completos são incapazes de matar as mesmas linhas celulares de melanoma.

A administração de ImmunoBody também se comparou com a imunização com péptido DC +. Os ratinhos C57BI/6 receberam três imunizações semanais com ADN ou péptido DC +. As respostas específicas de péptido de TRP2 foram de frequência comparável, mas os ratinhos imunizados com ImmunoBody geraram respostas de maior avidéz em comparação com os imunizados com péptido DC + (Figura 32d). Isto também se demonstrou quando estas respostas foram analisadas em relação a capacidade para matar células de melanoma B16F10 *in vitro* (Figura 32e). As respostas geradas por imunização com ImmunoBody mostraram maiores mortes de melanoma B16F10 a menor razão de efector e alvo que as respostas de ratinhos imunizados com péptido DC +. Também mostraram maior lise específica da linha de melanoma B16F20 siKb que tinha níveis reduzidos de H-2Kb.

As construções de ImmunoBody que continham o epítipo de Ovoalbumina restringido por H-2Kb, SIINFEKL, e o epítipo de gp100 restringido por HLA-A2 modificado em ancoragem, IMDQVPFSV (21 CM) compararam-se com a imunização com péptido epitópico correspondente em ratinhos C57BI/6 ou HHDII respectivamente. Os ratinhos receberam três imunizações semanais com ADN ou péptido em IFA. A análise das respostas depois da imunização final revela que os ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody geram respostas específicas de péptido de maior frequência em comparação com ratinhos imunizados com péptido (Figura 32f e g). Estas respostas também foram analisadas em relação a avidéz por titulação de péptidos. A imunização com ImmunoBody induz respostas de avidéz significativamente maior que a imunização com péptido (Figuras 32h e i).

A magnitude da resposta específica de TRP2 gerada pela vacina de ADN de ImmunoBody é muito superior à gerada por

péptido sintético ou antigénio de TRP2 completo. No entanto, as provas de ensaios clínicos sugerem que a presença de uma frequência alta de linfócitos T CD8 específicos de tumor não conduz necessariamente à regressão tumoral e geralmente em ensaios de vacina a taxa de resposta clínica objectiva é muito baixa (Rosenberg *et al*, J Immunol 2005; 175: 6169-76; Rosenberg *et al*, Nature Medicine 2004; 10: 909-15). Está a tornar-se evidente agora que factores distintos da frequência tais como avidéz funcional dos linfócitos T específicos de tumor e a via de sensibilização são determinantes importantes na maximização da eficácia de vacina. Vários grupos mostraram que os linfócitos T CD8 de alta avidéz demonstram actividade antitumoral superior (Alexander-Miller, Immunologic research, 2005; 31: 13-24; Hodge *et al*, J Immunol 2005; 174: 5994-6004; Valmori *et al*, J Immunol 2002; 168: 4231-40; Zeh *et al*, J Immunol 1999; 162: 989-94; Alexander-Miller *et al*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1996; 93: 4102-7). No estudo dos investigadores, a análise da avidéz funcional de respostas específicas de TRP2 induzidas por ImmunoBody demonstrou que pode ser gerada uma resposta de alta avidéz em comparação com imunização com péptido sintético. Esta resposta de alta avidéz também se correlaciona com a capacidade melhorada para reconhecer e matar células tumorais *in vitro*. O sinal da APC ou via de sensibilização da resposta também é crucial para a indução de respostas imunes de alta avidéz (Oh *et al*, J Immunol 2003; 170: 2523-30).

Exemplo 4 - Podem ser processados múltiplos epítomos do local CDR H2

Para demonstrar que múltiplos epítomos podem ser processados e apresentados de CDR H2 para induzir uma resposta imune, o epítopo restringido por H-2Kb SIINFEKL

(DCIB24; Figura 21) de ovoalbumina e o epítopo de Hepatite B restringido por H-2Kd IPQSLDSWWTSL (DCIB21; Figura 33) foram inseridos por engenharia genética no local H2 na região variável pesada. Estas construções de ImmunoBody também continham um epítopo de Hepatite B CD4 restringido por I-Ab (TPPAYRPPNAPIL) ou epítopo de hemaglutinina de gripe restringido por I-Ad (FERFEIFPKE) no local CDR L1 na região variável leve.

Foram imunizados ratinhos C57BI/6 ou Balb/c três vezes a intervalos semanais por via intradérmica com ADN de ImmunoBody por meio do bombardeamento de partículas. Os esplenócitos foram analisados posteriormente por elispot de IFN γ em relação à presença de respostas de CD8 e CD4 específicas de epítopo.

Os ratinhos imunizados C57BI/6 demonstraram respostas específicas de SIINFEKL de alta frequência, mas menores respostas específicas para o epítopo auxiliar (Figura 34a). Os ratinhos Balb/c também criaram respostas de CD8 específicas de epítopo de Hepatite B de alta frequência com níveis de resposta similares ao epítopo auxiliar (Figura 34b).

Estes dados sugerem que o processamento e apresentação de epítopos de CD8 do local CDR H2 não estão restringidos por sequência ou comprimento de epítopo específico.

Exemplo 5 - Podem ser processados múltiplos epítopos de CTL da região variável

Para demonstrar que podem ser processados e apresentados epítopos da região variável e não somente as regiões CDR, incorporam-se epítopos no local CDR H1 com a retirada de parte da região flanqueante.

Os epítopos exemplares são os epítopos restringidos por HLA-A2 modificados IMDQVPFSV (DCIB17; Figura 35) de gp100 e FLPATLTMV de Tie-2 (DCIB26; Figura 36). As

construções de ImmunoBody também continham o epítopo de Hepatite B CD4 no local CDR L1.

Foram imunizados ratinhos transgênicos HLA-A2 (HHDII) três vezes a intervalos semanais por via intradérmica com ADN de ImmunoBody por meio do bombardeamento de partículas. Os esplenócitos foram analisados posteriormente por elispot de IFN γ em relação à presença de respostas de CD8 e CD4 específicas de epítopo.

Os ratinhos HHDII induziram respostas específicas de epítopo de gp100 210M de alta frequência com respostas razoáveis para o epítopo de HepB CD4 (Figura 37a). As respostas em ratinhos HHDII imunizados com a construção que continha o epítopo de Tie2 não eram de frequência tão alta, mas foram geradas respostas específicas consideráveis tanto para o epítopo de Tie2 como o epítopo de HepB CD4 (Figura 37b).

Os dados neste exemplo indicam que os epítopos inseridos dentro da região variável podem ser processados e apresentados para induzir uma resposta imune *in vivo*. Também resulta evidente que isto não se restringe a uma sequência de epítopo.

Exemplo 6 - Podem ser geradas múltiplas respostas de CTL de diferentes epítopos dentro da mesma construção de ImmunoBody

O epítopo de gp100 restringido por HLA-A2 previamente mencionado IMDQVPFSV foi inserido por engenharia genética no local CDR H1 junto com o epítopo de TRP2 SVYDFFVWL que também está restringido através de HLA-A2 no local CDR H2 da mesma construção. O epítopo de HepB CD4 estava presente no local CDR L1 (DCIB15; Figura 19).

Os ratinhos HHDII foram imunizados três vezes a intervalos semanais por via intradérmica com ADN de ImmunoBody por meio do bombardeamento de partículas. Os esplenócitos foram analisados posteriormente por elispot de

IFN γ em relação à presença de respostas de CD8 e CD4 específicas de epítopo.

A Figura 38a mostra que se geram respostas específicas para os epítomos tanto de gp100 como de TRP2, embora a frequência das respostas específicas de TRP2 são menores. Também se geram respostas de péptido de HepB CD4. A avidéz das respostas específicas de TRP2 também foi estudada por titulação peptídica em elispot de IFN γ . A avidéz das respostas varia de 10^{-10} M a 10^{-11} M de péptido para o epítopo de gp 100 e 10^{-9} M a 10^{-10} M de péptido para o epítopo de TRP2. Mostram-se exemplos representativos na Figura 38b. Para determinar se as respostas são capazes de matar as células alvo *in vitro*, foram estimulados esplenócitos com blastos de LPS pulsados com péptido TRP2 e gp100 *in vitro* durante 6 dias e foram analisados num ensaio de libertação de cromo contra células T2 marcadas com péptido e células de melanoma B16F10 HHD. A morte específica de linha de melanoma B16F10 HHD era comparável à da linha de melanoma B16F10 de controlo. As respostas também demonstraram lise específica de células T2 marcadas com péptido em comparação com o controlo (Figura 38c).

A combinação de dois epítomos de CD8 numa construção de ImmunoBody simples parece dar como resultado um grau de imunodominância entre os epítomos. O epítopo imunodominante é o epítopo com a maior afinidade pelo MHC de classe I. Quando os ratinhos imunizados com a construção que contém epítomos tanto de gp100 como de TRP2 CD8 são comparados com os imunizados com uma construção que contém somente o epítopo de TRP2 CD8, a frequência da resposta de TRP2 diminui (Figura 38d).

Estes dados demonstram que podem ser geradas respostas imunes específicas de epítopo da mesma construção de ADN específica para dois epítomos de CD8 diferentes. Estes também são capazes de actividade antitumoral *in vitro*. No

entanto, existe um grau de imunodominância que governa a frequência da resposta ao epítopo subdominante.

Realizou-se um estudo similar com construções de ImmunoBody separadas que continham o epítopo de TRP2 em CDRH2 (DCIB18) ou o epítopo SIINFEEKL em CDRH2 (DCIB24). Os ratinhos foram imunizados com DCIB18 ou DCIB24 somente, DCIB18 e DCIB24 combinados no mesmo local ou DCIB18 e DCIB24 à vez, mas em locais separados. Realizaram-se imunizações três vezes a intervalos semanais e injectou-se ADN i.m. No músculo tibial em combinação com electroporação. A análise das respostas imunes geradas mostra que podem ser induzidas respostas específicas de péptido de alta frequência quando os ratinhos foram imunizados com DCIB18 ou DCIB24 somente (Figura 38e). A imunização de ratinhos com estas construções no mesmo local tem como resultado a perda significativa da resposta específica de péptido TRP2. Isto sugere que o epítopo SIINFEEKL é dominante sobre o epítopo de TRP2. A resposta específica de TRP2 pode ser recuperada se os ratinhos forem imunizados com construções em locais separados ($p=0,0026$). Estes dados sugerem que a imunodominância influi nas respostas imunes geradas por imunização com IB, mas isto pode ser resolvido por imunização em locais separados espacialmente.

Exemplo 7 - As modificações de resíduos não de ancoragem podem potenciar o reconhecimento de linfócitos T

O exemplo anterior mostra que o epítopo de gp100 modificado IMDQVPFSV é imunodominante e tem uma alta afinidade por HLA-A2 (predito utilizando o algoritmo de SYFPEITHI e demonstrado no ensaio de estabilização de T2 - Quadro 5). Já que o epítopo de gp100 de tipo selvagem ITDQVPFSV não é imunogénico, realizaram-se modificações em resíduos não de ancoragem que teriam uma afinidade de união a HLA-A2 similar à do epítopo de tipo selvagem, mas também

potenciaria a imunogenicidade. Estes epítomos modificados foram inseridos por engenharia genética no local CDR H1 da construção de ImmunoBody e foram ensaiados junto com o epítomo de tipo selvagem (DCIB37, DCIB40, DCIB41, DCIB42, DCIB43; Figuras 39-43).

Foram imunizados ratinhos HHDII três vezes a intervalos semanais por via intradérmica com ADN de cadeia pesada de ImmunoBody somente por meio do bombardeamento de partículas. Os esplenócitos foram analisados posteriormente por elispot de IFN γ em relação à presença de respostas de CD8 específicas de epítomo. Duas modificações (F7L e F7I; DCIB37; Figura 39, DCIB40; Figura 40) do epítomo de gp100 de tipo selvagem que conservavam a afinidade por HLA-A2 (Quadro 5) demonstraram uma capacidade superior para induzir respostas imunes específicas de epítomos em comparação com o epítomo de tipo selvagem (Figura 44a).

Quadro 5

Antigénio	Epítomo	Ensaio de estabilização de T2 (m.f.i)	Pontuação de SYFPEITHI
Gp100 (210M)	IMDQVPFSV	23,1	22
Gp100 (wt)	ITDQVPFSV	18,5	18
Gp100 (F7L)	ITDQVPLSV	18	19
Gp100 (F7I)	ITDQVPISV	Nd	18
TRP2	SVYDFVWL	19	21
Controlo		7,29	–

Exemplo 8 - Podem ser processadas e apresentadas múltiplas respostas auxiliares de CD4 para induzir uma resposta imune *in vivo*

Para examinar se os epítomos auxiliares de CD4 podiam ser processados e apresentados para induzir uma resposta imune *in vivo*, foram inseridos por engenharia genética de forma independente diferentes epítomos no local de CDR L1 da construção de ImmunoBody. Estes incluem o epítomo

restringido por I-Ad FERFEIFPKE (DCIB21; Figura 33) de hemaglutinina da gripe, o epítopo restringido por I-Ab TPPAYRPPNAPIL de HBcAg (DCIB15; Figura 19) e o epítopo restringido por HLA-DR4 WNRQLYPEWTEAQRLD de gp100 (DCIB35; Figura 45).

Foram imunizados ratinhos transgênicos Balb/c, C57BI/6 ou HHDII e DR4 três vezes a intervalos semanais por via transdérmica com ADN de ImmunoBody por meio do bombardeamento de partículas. Foram analisados posteriormente os esplenócitos por meio de elispot de IFN γ em relação à presença de respostas de CD4 específicas de epítopo. As Figuras 46a, b e c demonstram que os três epítopos auxiliares de CD4 podem ser processados e apresentados do local CDR L1 para induzir uma resposta imune específica de epítopo *in vivo*.

O epítopo restringido por HLA-DR4 de gp100 também se ensaiou em relação ao processamento e apresentação de diferentes CDR. As construções que incorporam o epítopo em CDRL1 (DCIB35; Figura 45), CDRH3 (DCIB54; Figura 29) ou CDRL3 (QCIB50; Figura 47) foram utilizadas para imunizar ratinhos transgênicos HLA-DR4 três vezes a intervalos semanais. A Figura 46d mostra que o epítopo auxiliar pode ser processado eficazmente de diferentes CDR para induzir respostas auxiliares de alta frequência.

Exemplo 9 - As respostas de CTL são parcialmente dependentes da cadeia pesada secretada, mas as respostas auxiliares não requerem cadeia leve secretada

Classicamente são processados epítopos de linfócitos T CD4 de proteínas que se adquirem de forma exógena e epítopos de linfócitos T CD8 de proteínas produzidas de forma endógena. Existem provas agora de que a apresentação cruzada de epítopos de antígenos adquiridos de forma exógena induz uma resposta mediada por linfócitos T CD8. Também foi proposto que esta via de sensibilização é mais

eficaz no desenvolvimento de respostas imunes mediadas por linfócitos T CD8. Recentemente ocorreram achados similares para respostas mediadas por CD4. As provas crescentes sugerem que os epítomos de linfócitos T CD4 derivados de proteínas intracelulares podem ser processados e apresentados no contexto de MHC de classe II.

Para determinar se seria requerido ImmunoBody secretado para a indução de respostas de linfócitos T CD8 e CD4, prepararam-se construções de ImmunoBody que continham o epítomo de gp100 restringido por HLA-A2 IMDQVPFSV no local CDR H1 e o epítomo auxiliar de HepB restringido por I-Ab TPPAYRPPNAPIL no local de CDR L1 sem sequências líder na cadeia pesada ou cadeia leve (Figuras 10 e 11).

Foram imunizados ratinhos HHDII três vezes em intervalos semanais por via intradérmica com ADN de ImmunoBody por meio do bombardeamento de partículas. Os esplenócitos foram analisados posteriormente por meio de elispot de IFN γ em relação à presença de respostas de linfócitos T CD8 e CD4 específicas de epítomo. Quando as respostas foram analisadas em relação a resposta de CD8 específica de gp100, observou-se que a retirada da sequência líder da cadeia pesada da construção de ImmunoBody tinha como resultado uma redução das respostas específicas de epítomo, no entanto as respostas de CD4 não foram afectadas (Figura 48a). A retirada da sequência líder da cadeia pesada afectou à secreção de cadeia pesada pelas células CHO-S transfectadas (Figura 48b). A retirada da sequência líder da cadeia leve, evitando deste modo a secreção de cadeia leve, não pareceu afectar às respostas de CD8 ou CD4 específicas de epítomo (Figura 48c). As respostas de CD8 reduziram-se significativamente na ausência de uma sequência líder na cadeia pesada, mas as respostas de CD4 não foram afectadas (Figuras 48c e d).

Estes dados implicam que a secreção de cadeia pesada é importante para a indução eficaz de uma resposta de linfócitos T CD8, o que sugere que os epítomos de CD8 estão a passar por apresentação cruzada. Em segundo lugar, implica que os epítomos de CD4 derivam de ImmunoBody intracelular para induzir uma resposta imune.

Exemplo 10 - Respostas de CTL reduzidas sem Fc devido a falta de secreção de proteína

Esta experiência examina se a presença da região Fc é benéfica para estabelecer uma resposta imune eficaz. A região Fc foi retirada da construção de ImmunoBody, que contém o epítomo de TRP2 restringido por H-2Kb SVYDFFVWL em CDR H2 e o epítomo de HepB CD4 restringido por I-Ab TPPAYRPPNAPIL em CDR L1 (OCIB15), incorporando um codão de parada antes do Fc para evitar a transcrição e tradução (Figura 9).

Foram imunizados ratinhos C57BI/6 três vezes a intervalos semanais por via intradérmica com ADN de ImmunoBody por meio do bombardeamento de partículas. Os esplenócitos foram analisados posteriormente por elispot de IFN γ em relação à presença de respostas de linfócitos T CD8 e CD4 específicas de epítomo.

Os ratinhos imunizados com a construção de ImmunoBody sem a região Fc geraram um nível baixo de resposta específica de péptido TRP2 que era capaz de reconhecimento de nível muito sob da linha celular tumoral B16F10 em comparação com uma construção com a região Fc (Figura 49a). A análise das respostas específicas de péptido auxiliar HepB e TRP2 de várias experiências demonstra que as construções sem a região Fc geram respostas específicas de péptido TRP2 significativamente mais baixas (Figura 49b). No entanto, as respostas auxiliares de HepB não foram afectadas pela retirada da região Fc (Figura 49c). Isto é coerente com os resultados anteriores dos investigadores

que mostram que a ajuda funciona melhor na cadeia leve quando não é secretada e funciona portanto por apresentação directa. Ao contrário, as respostas de CTL são estimuladas por apresentação tanto directa como indirecta e a segunda pode beneficiar-se da direcção a Fc. Como alternativa a construção sem Fc tem como resultado menor secreção da cadeia pesada truncada o que pode explicar a resposta reduzida. Obteve-se por engenharia genética portanto um ImmunoBody que codificava TRP-2 com uma IgG2 (DGIB33) e uma região constante de IgG3 (DCIB65). A primeira não deveria unir-se a CD64, mas pode ser unida a CD32 e também pode ser unida ao receptor IV de Fc em ratinhos. A IgG3 humana pode ser unida tanto a CD32 como CD64. Ambos ImmunoBodies estimularam respostas de CTL fortes (Figura 49e). Isto sugere que a direcção de Fc não é um componente forte da apresentação indirecta. Para verificar adicionalmente esta questão, o domínio de direcção Fc de IgGt foi substituído com o domínio de IgG2 equivalente e vice-versa (DCIB56, 67, Figuras 15 e 16). Ambas as construções estimularam respostas de CTL fortes (Figura 49e). Isto pode ser devido a que as vacinas de ImmunoBody[™] somente secretam cadeia pesada que pode não estar associada e permitir a união de Fc (Figura 49f e g).

Exemplo 11- A imunização com ImmunoBody potencia as respostas imunes e supera a regulação observada do antigénio completo. Também permite a identificação de novos epítomos de linfócitos T heterólogos.

Isto pode conduzir ao segundo benefício de imunização com um epítomo de linfócitos T que codificam anticorpo humano que é, a diferença da maioria dos antigénios próprios, um portador inerte que não expressa epítomos reguladores. Um ImmunoBody[™] que expressa um epítomo de gp100 ou um epítomo de TRP-2 estimulou uma resposta de linfócitos T de alta avidéz de alta frequência (frequência

$1/10^3$ avides 10^{-10} M) enquanto que a imunização com o antígeno de gp100 ou TRP-2 completo estimulou linfócitos T com baixa frequência e avides (frequência $1/10^5$ avides 10^{-7} M). O esgotamento de CD25 restaurou parcialmente a resposta ao antígeno, mas o ImmunoBody ainda era 100 vezes superior (Figura 50a e b).

De forma similar a imunização com ADN que codifica os primeiros 200 aminoácidos de Tie-2 ligado a Fc, não estimulou uma resposta imune aos 10 epítopos preditos superiores. A sequência dos primeiros 196 aminoácidos de Tie-2 foi introduzida nos algoritmos de predição em linha EpiJen e NetCTL. Ambos estes métodos levam em conta a excisão proteossômica e transporte de TAP além de predizer a afinidade de união a HLA-A*0201. Os algoritmos MHCpred e Syfpeithi foram utilizados também como exemplos dos algoritmos de predição mais antigos que somente levam em conta a afinidade de união ao MHC predita. A molécula de Tie-2 completa poderia conter epítopos de CTL adicionais que podem exercer um efeito imunodominante sobre os presentes nos primeiros 196 aminoácidos. A sequência completa de Tie-2 foi introduzida também portanto nos mesmos algoritmos para obter os intervalos de cada epítipo predito da molécula completa. Os péptidos que não eram homólogos em ratinhos e homens foram descontados. Seleccionaram-se seis dos péptidos restantes que se prediziam consistentemente que representavam bons epítopos de CTL por vários algoritmos diferentes de predição. As pontuações relativas obtidas com os diferentes algoritmos para cada um destes péptidos, junto com resultados para Z83 (um epítipo previamente identificado), são resumidos no Quadro 6.

Dados adicionais da análise de sobrenadante de células CHO-S transfectadas demonstram que somente as construções com epítopos de CTL incorporados na CDRH3 ou CDRL3 são

secretadas como anticorpo intacto (Figura 20e). Ao contrário, a incorporação de qualquer epítopo dentro da CDRH1 ou CDRH2 permitiu a secreção de quantidades pesadas, mas baixas de anticorpo intacto inclusive se não foi incorporado nada dentro da cadeia leve e secretado. A incorporação de qualquer epítopo dentro de CDRL1 da cadeia leve tinha como resultado secreção de nível baixo da cadeia leve inclusive se somente havia um epítopo incorporado na CDRH3 da cadeia pesada.

Para determinar se existe um repertório de linfócitos T em ratinhos transgênicos HLA-A*0201 que reconheça qualquer dos epítopos de CTL preditos de Te-2, os animais foram imunizados com a construção de ADN de Tie2 C200hFc nativa (Ramage *et al.* Int. J. Cancer 2004; 110: 245-250) e os esplenócitos foram explorados em relação a respostas de IFN γ específicas de péptido num ensaio de ELISPOT. Imunizou-se um grupo separado de ratinhos com C200hFc depois de tratamento com PC61, como antes, 4 dias antes da imunização com ADN.

Os ratinhos que foram imunizados com a construção de C200HFc nativa não montaram uma resposta de IFN γ que reconhecesse Z83, independentemente de se fossem esgotados os linfócitos T reguladores CD25⁺ dos animais antes da imunização ou não. Não houve respostas de IFN γ significativas para nenhum dos novos péptidos ensaiados de animais em que não se esgotaram os linfócitos T reguladores antes da imunização, com a exceção de Z284 que parecia estimular uma resposta num animal (M3) com uma média de 69 SFC/milhão de esplenócitos (Figura 50c e d). Dos animais em que foram esgotados os linfócitos T reguladores antes da imunização de ADN, 213 animais (my e M3) demonstraram uma resposta de IFN γ à reestimulação com péptido Z282, com valores médios de 320 e 94 SFC/milhão de esplenócitos respectivamente. M1 também demonstrou uma resposta parcial

à reestimulação com Z285, com uma média de 85 SFC/milhão de esplenócitos.

Os resultados aparentemente em conflito do rastreio *in vivo* dos epítomos de CD8⁺ preditos de Tie-2 poderiam ser o resultado de imunodominância, já que as respostas de IFN γ dos ratinhos que foram imunizados com a construção de C200HFc nativa na ausência de células CD25⁺ pareciam inclinar-se em direcção a um péptido predominante. Para investigar adicionalmente o repertório de linfócitos T que está disponível para responder ao epítomo Z282, na ausência de competição de outros epítomos de CD8⁺ potenciais, imunizou-se a um grupo de ratinhos HHD com o péptido de Z282 em IFA na presença ou ausência de linfócitos T reguladores CD25⁺. Todos os ratinhos imunizados com Z282 montaram respostas de IFN γ específicas de péptido, inclusive quando foram imunizados na presença de linfócitos T reguladores CD25⁺. O ratinho 3 dos animais não empobrecidos montou a resposta mais alta, com um valor médio de 215 SFC/milhão de células. A resposta mais alta dos animais empobrecidos foi observada do ratinho 2 com um valor médio de 137 SFC/milhão de células (Figuras 50e e f).

As respostas induzidas por imunização com péptido continuam a ser de baixa frequência. Para examinar se seria possível gerar respostas de maior frequência se o epítomo fosse retirado de qualquer influência reguladora gerada pelo antigénio completo, o epítomo de z282 (também conhecido como z12) foi introduzido por engenharia genética no local H1 de uma construção de ImmunoBody junto com Hep B CD4 em L1 (DCIB71, Figura 51). Foram imunizados depois ratinhos transgénicos HLA-A2 com péptido z12 ou ADN de ImmunoBody (por meio de bombardeamento de partículas) três vezes a intervalos semanais e depois foram analisados em relação à presença de respostas imunes específicas de epítomo. Todos os ratinhos imunizados com péptido z12

mostram respostas específicas de epítipo de baixa frequência e avides (Figura 50g). No entanto, quando o epítipo z12 é introduzido por engenharia genética na construção de ImmunoBody induzem-se respostas de maior frequência e avides em todos os ratinhos (Figura 50h).

Para resumir, se forem empobrecidas as células CD25 antes da imunização, seria estimulada uma resposta imune a 3/10 dos epítopos de Tie2. De forma similar se um destes epítopos fosse apresentado como um péptido, poderiam ser geradas respostas imunes fracas. No entanto, se este epítipo fosse apresentado dentro de uma construção de ImmunoBody™ seriam geradas respostas de linfócitos T de alta frequência e alta avides. Estes resultados sugerem que existem epítopos de T-reg dentro dos primeiros 200 aminoácidos de Tie-2 que inibem respostas de CTL. Se estes T-reg ou seus epítopos fossem retirados seria possível revelar uma resposta a antígenos próprios que pode ser potenciada adicionalmente por apresentação dentro de um ImmunoBody.

Nome ¹	Começo ²	Péptido ³	EpiJen ⁴		NetCTL ⁵		Sytpethi ⁶		MHCPre ⁷	
			Pontuação (CI50 nM)	Intervalo	Pontuação	Intervalo	Pontuação	Intervalo	Pontuação (CI50 nM)	Intervalo
Z83	124	FLPATLTM T	---	---	0,73	9 (27)	19	18 (55)	2978	96 (55)
Z282	27	ILINSLPL V	0,05	1	1,39*	1	29	1 (2)	16	2 (6)
Z283	146	VLIKEEDA V	0,23	2 (5)	0,7	10 (31)	24	5 (11)	89	9 (34)
Z284	64	LMNQHQD PL	0,98	3 (7)	0,88*	3 (11)	21	9 (32)	113	11 (51)
Z285	8	VLCGVSL L	1,19	4 (10)	0,94*	2 (9)	24	4 (10)	242	21 (125)
Z286	34	LVSDAETS L	---	---	0,74	8 (26)	19	15 (52)	887	65 (349)

Z287	26	LILINSLP L	---	---	0,88*	4 (12)	23	7 (16)	607	57 (271)
Z18	(flu)	GILGFVFT L	0,19	(1)	1,29	(2)	30		419	(87)

Quadro 6. Epítomos de CTL restringidos por HLA-A*0201 preditos de Tie-2, ¹Nome do péptido. ² Posição de começo do resíduo de aminoácido dentro da molécula de Tie-2. ³ Sequência peptídica. ⁴ Predição utilizando o servidor web EpiJen. A pontuação é proporcionada em unidades de CI_{50} nM, representando as pontuações mais baixas péptidos de maior afinidade. ⁶ Predição utilizando o servidor web NotCTL 1.2. A pontuação representa a soma ponderada de três métodos de predição individuais, indicando uma ponderação relativa de união a MHC de 1 uma pontuação acima do valor limite de 0,75 identificado como o ponto de corte para epítomos de CTL do conjunto de dados obtido para epítomos conhecidos. Predição utilizando o programa SYFPEITHI. A pontuação máxima para péptidos de união a HLA-A*0201 é 36. ⁷ Predição utilizando o método aditivo de MHCpred para predizer a afinidade dos péptidos por MHC e TAP. A pontuação é proporcionada de novo em unidades de CI_{50} nM, representando as pontuações mais baixas péptidos de maior afinidade. Os valores de CI_{50} sugeridos estão entre 0,01 e 5000 nM. Para todos os métodos de predição, os valores de intervalo indicam a ordem em que os epítomos são preditos do fragmento de 196 aminoácidos, representando os valores entre parenteses as predições de intervalo da molécula de Tie-2 completa. Os valores obtidos para o epítopo de Z18 CTL conhecido derivado da proteína de matriz do vírus da gripe A são incluídos para comparação.

Exemplo 12 - O papel de Fc xenogénico ao proporcionar ajuda de linfócitos T e o requisito de ajuda de linfócitos T específica de antígeno

A estimulação de respostas de linfócitos T de alta avidéz habitualmente requer ajuda de linfócitos T durante a sensibilização. Concebeu-se originalmente que esta se proporcionaria pelo epítopo auxiliar estranho Hep B codificado dentro da cadeia leve. De facto, são geradas respostas auxiliares fortes para este epítopo. No entanto, a medida que se secretava a cadeia pesada e não a cadeia leve embora o epítopo de hep B poderia ter proporcionado ajuda para a apresentação directa quando se produzisse ambas cadeias pela mesma APC é pouco provável que pudesse proporcionar ajuda para a cadeia pesada apresentada de forma indirecta já que é pouco provável que esta se capte pela mesma célula apresentadora de antigénios. Foram imunizados portanto ratinhos com um vector de ADN que codifica somente a cadeia pesada. Geraram-se ainda respostas de CTL de alta avidéz e alta frequência (Figura 53 a e b). Isto implica que não se requer ajuda ou que o Fc humano que é xenogénico em ratinhos está a proporcionar ajuda estranha ligada. Avaliou-se portanto uma construção de IgG2a de ratinho em relação a secreção de cadeias pesadas e leves (Figura 49g) e rastreou-se em relação a geração de respostas imunes (OCIB53 Figura 54). Embora ainda proporcionasse resposta de linfócitos T de alta avidéz e alta frequência estas não foram tão fortes como a construção humana equivalente o que sugere que o Fc xenogénico estava a proporcionar ajuda ligada (Figura 53c e d). Foi incorporado depois um epítopo de gyp100 HLA-DR4 na construção de IgG2a de ratinho (DCIB64, Figura 55) para proporcionar ajuda ligada para geração de CTL, mas também ajuda de linfócitos T específicos de antigénio para estimular a inflamação dentro do ambiente tumoral. Estas construções estimulam respostas auxiliares e de CTL de alta avidéz e alta frequência (Figura 53e e f). Pode ser

utilizado uma construção de hIgG1 que expresse o mesmo epítopo em pacientes humanos.

Exemplo 13 - O processamento de imunoproteassoma é importante na geração de respostas de epítomos dentro de construções de ImmunoBody

Sugeriu-se que o imunoproteassoma tem a capacidade de alterar a disposição dos epítomos gerados de antígenos próprios já que possui um padrão diferente de excisão. Em alguns casos, geram-se novos epítomos após a regulação positiva do imunoproteassoma e em outros se destroem os epítomos. Existem provas de que o imunoproteassoma é incapaz de gerar vários epítomos derivados de antígenos de melanoma, a saber MelanA/MART-1, gp100²⁰⁹⁻²¹⁷ e Tirosinase³⁶⁹⁻³⁷⁷ (Chapiro *et al* 2006. *J Immunol*; 176:1053-61). Chapiro *et al* sugeriram que a capacidade para processar e apresentar o epítopo de gp100 está relacionada com a regulação positiva do imunoproteassoma. Acredita-se que as DC maduras sejam responsáveis pela sensibilização de respostas imunes e sabe-se que expressam constitutivamente o imunoproteassoma (Macagno *et al.* 2001. *Eur J Immunol*; 31: 3271-80). O epítopo de gp100²⁰⁹⁻²¹⁷ foi introduzido portanto por engenharia genética no local de CDRH1 de uma construção de ImmunoBody e ensaiou-se em relação a sua capacidade para induzir respostas imunes específicas de péptido em ratinhos transgênicos HLA-A2. Não foram observadas respostas específicas de péptidos desta construção (Figura 56). No entanto, quando o epítopo se modificou para possuir uma metionina na posição 210 (210M) em lugar de treonina isto evitou sua excisão pelo imunoproteassoma e observaram-se respostas específicas de epítopo (Figura 56).

Também foram ensaiadas um péptido restringido por HLA-A2 derivado de VEG32 (aa 773-781 VIAMFFWLL) e dois péptidos de hTERT modificados (aa 572-580 YLFFYRKSV e aa 988-997 YLQVNSLOTV) em relação a geração de respostas de

construções de ImmunoBody. Descobriram-se estes epítomos inicialmente por predição de epítomos *in silico* e imunização por péptido negando portanto o requisito de processamento proteossómico. No entanto, são apresentados na superfície de células hospedeiras tumorais/endoteliais o que sugere que são processados a partir de antígeno completo por meio do proteassoma constitutivo. Nenhum destes epítomos gerou respostas quando foram introduzidos por engenharia genética na construção de ImmunoBody o que sugere que pode ser requerido o processamento por meio do imunoproteassoma para geração eficaz de respostas imunes.

Exemplo 14- Diferentes métodos de imunização são eficazes na indução de respostas imunes de vacina de ImmunoBody

Foi mostrado que a vacina de ImmunoBody é eficaz na indução de respostas de CD8 e CD4 de alta frequência e avidéz quando se administram por meio de bombardeamento de partículas. A vacina de ImmunoBody foi ensaiada posteriormente em relação a geração de respostas de linfócitos T utilizando outros métodos de imunização.

Foram imunizados ratinhos C57Bl-6 com ADN de ImmunoBody que continha o epítomo de TRP2 em CDRH2 por meio da via i.d. ou i.m. As imunizações foram combinadas com e sem electroporação e foram realizadas três vezes a intervalos semanais.

Os ratinhos imunizados com bombardeamento de partículas mostram respostas específicas de péptido TRP2 de alta frequência. Estas são comparáveis em ratinhos imunizados por meio de via i.m. ou i.d. combinada com electroporação. A imunização, por meio de via i.m. ou i.d. na ausência de electroporação gerou respostas específicas de péptido TRP2 de frequência menor (Figura 57a). Todas as respostas específicas de péptido TRP2 são de alta avidéz de acordo com a medição por titulação de péptidos (Figura 57b).

Exemplo 15 - A imunização com ImmunoBody induz despigmentação de tipo vitiligo e protege contra desafio tumoral

Já que os ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody geram respostas imunes capazes de actividade citotóxica frente à linha celular tumoral altamente metastásica e escassamente imunogénica B16F10, a vacina foi ensaiada em relação a eficácia protectora *in vivo*.

Foram imunizados ratinhos com ADN de IB (DCIB1B; Figura 30) por meio de bombardeamento de partículas na pele afeitada do abdómen a intervalos de cinco semanas. Na metade do programa de imunizações, injectou-se aos ratinhos i.v. 1×10^4 células B16F10 que expressavam IFN α que forma tumores metastásicos no pulmão. Quando se permitiu que o pelo crescesse de novo depois da última imunização, observou-se que os ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody tinham crescimento de pelo alvo no local de imunização (Figura 58a). Sete semanas depois da injeção de células tumorais, os ratinhos foram sacrificados e foi analisado o número de metástase de pulmão internas e externas. Os ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody mostraram uma redução significativa no número de metástase de pulmão em comparação com ratinhos de controlo não tratados (Figura 58b).

Também se imunizou aos ratinhos com ADN de IB (DCIB18) por meio de bombardeamento de partículas a três intervalos semanais. Sete dias depois da imunização final os ratinhos foram desafiados com 2×10^4 células B16F10 que expressavam IFN α de forma subcutânea. Os ratinhos foram monitorizados em relação ao crescimento tumoral e sobrevivência. Os ratinhos foram sacrificados uma vez que os tumores alcançassem o limite máximo de acordo com as regulações do Ministério do Interior. Os ratinhos imunizados com ADN de ImmunoBody mostraram crescimento tumoral subcutâneo

significativamente mais lento e sobrevivência prolongada (Figura 58c e d).

A resposta específica de TRP2 está mediada por CD8 já que o esgotamento das células CD8+ suprime a resposta. Identificaram-se os linfócitos T CD8 como um factor importante na imunização antitumoral e os resultados dos investigadores mostram que a imunização com ADN de ImmunoBody induz a imunidade antitumoral *in vivo* num modelo de ratinho. Todos os ratinhos imunizados sem sinais de doença mostraram despigmentação de tipo vitiligo da pelagem no local de imunização. Anteriormente, o vitiligo era associado com frequência à protecção tumoral em ratinhos e foi correlacionado em grande medida com imunoterapia de IL-2 bem-sucedida em pacientes com melanoma metastásico (Overwijk *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999; 96: 2982-7; Lance *et al.*, Cancer Research 2004; 64: 1509-14; Steitz *et al.*, Cancer Immunol Immunother 2006, 55: 246-53; Rosenberg & White, J Immunother Emphase Tumor Immunol 1996;19: 81-4).

Exemplo 16 - A imunização com ImmunoBody retarda significativamente o crescimento tumoral.

Foi mostrado previamente que a imunização com ImmunoBody protege significativamente contra a apresentação de tumor. A vacina foi ensaiada posteriormente em relação a eficácia num ambiente terapêutico.

Injectou-se aos ratinhos C57BI/6 s.c. 2×10^4 células tumorais B16F1C. Quatro dias depois da injeção imunizou-se aos ratinhos com ADN de ImmunoBody que continha epítipo de TRP2 em CORH2 ou ADN de ImmunoBody de controlo. Realizaram-se imunizações repetidas nos dias 11 e 18 depois da injeção do tumor. O crescimento tumoral foi monitorizado a intervalos de 3-4 dias. Os ratinhos imunizados com ImmunoBody demonstram um retardamento significativo do

crescimento do melanoma B16F10 agressivo em comparação com ratinhos imunizados com o controlo (Figura 59a).

Realizou-se também um estudo similar utilizando a linha tumoral de IFN α B16F10 menos agressiva. Injectou-se aos ratinhos C57BI/6 2×10^4 células tumorais s.c. e imunizaram-se no dia 14 com ADN de ImmunoBody ou ADN de controlo. Realizaram-se imunizações repetidas nos dias 21 e 28 depois da injeção do tumor. Os ratinhos imunizados com ImmunoBody mostraram crescimento tumoral significativamente menor que os ratinhos imunizados com controlo no dia 47 depois da injeção tumoral (Figura 59b). Os dados anteriores sugeriram que o esgotamento de linfócitos T reguladores potencia a geração de respostas imunes, portanto realizou-se um estudo antitumoral. Neste estudo injectou-se aos ratinhos 2×10^4 células tumorais B16F10 s.c. e foram imunizados no dia 4, 11 e 18 com ADN de ImmunoBody ou ADN de controlo. No dia 0 foram esgotados os linfócitos T reguladores dos ratinhos por meio de injeção de anticorpo anti-CD25 (PC61). Simultaneamente com a segunda imunização também se injectou aos ratinhos anticorpo anti-CTLA4 uma vez que foi mostrado também que o bloqueio de CTLA-4 é benéfico na inibição de linfócitos T reguladores. O crescimento tumoral foi monitorizado e embora a imunização com ImmunoBody retarda significativamente o crescimento tumoral ($p=0,0188$) isto foi melhorado adicionalmente por tratamento com anticorpos anti-CD25 e anti-CTLA-4 ($p=0,001$) (Figura 59c). O tratamento com anticorpo anti-CD25 não pareceu retardar significativamente o crescimento tumoral observado em ratinhos imunizados com ImmunoBody.

Exemplo 17 - Podem ser geradas respostas imunes de construções de ImmunoBody expressas de diferentes cadeias principais de vector.

Foram analisadas as respostas quando as construções de ImmunoBody foram expressas a partir de diferentes cadeias principais de vector. Foi introduzida por engenharia genética uma construção de ImmunoBody que continha epítipo de gp100DR7 em CDRH1, epítipo de TRP2 em CDRH2 e epítipo de gp100DR4 em CDRH3 com cadeia leve de tipo selvagem nos vectores de expressão doble OCO_{orig} e DCVax (DCIB54, Figuras 18 e 29). Foram imunizados ratinhos transgênicos HLA-DR4 por meio de bombardeamento de partículas três vezes a intervalos semanais e as respostas foram analisadas *ex vivo* por ensaio de elispot de IFN γ .

Realizaram-se experiências similares utilizando uma construção de ImmunoBody que continha epítipo de gp100DR7 em CDRH1 e CDRL3, epítipo de TRP2 em CDRH2, epítipo de gp100DR4 em CDRH3 e CDRL1 (DCIB68, Figura 60). Esta construção foi inserida por engenharia genética nas cadeias principais de vector tanto OCO_{orig}, DCO_{orig} desprovido do promotor de SV40, como DCVax.

Os ratinhos imunizados com a construção de ImmunoBody no vector Orig (B1-3) demonstram respostas de epítipo de frequência similar em comparação com a construção de Immunobody no vector pVax (C1 -3) (Figura 61).

Em resumo, a tecnologia de ImmunoBody tem capacidade superior para induzir respostas imunes de CD8 e CD4 de alta frequência e avidéz a partir de uma armação de anticorpo não imunogénico que pode evitar eficazmente o crescimento tumoral *in vivo*. Tem a capacidade de dirigir-se a até seis antigénios diferentes simultaneamente e tem a capacidade de evitar o problema dos linfócitos T reguladores que com frequência aparece quando são utilizados imunogénios de antígeno completo. Esta tecnologia apresenta uma abordagem nova para a vacinação e demonstra o potencial para que os sistemas de ImmunoBody sejam utilizados como uma vacina

multivalente para muitos outros tipos de cancro e doenças relacionadas com microrganismos.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> SCANCELL LIMITED

<120> ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> P42394WO/NJL

<140> PCT/EP2008/053761

<141> 28-03-2008

<150> GB0706070.0

<151> 28-03-2007

<160> 247

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo restringido por I-Ad de hemaglutinina de gripe

<400> 1

Phe	Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys	Glu
1				5					10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Tie-2 z84

<400> 2

Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Val
1 5

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de gp100 CD4 restringido por HLA-DR7

<400> 3

Gly Thr Gly Arg Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val Thr val
1 5 10 15

Tyr His

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Tie-2 Z12

<400> 4

Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo gp100 restringido por HLA-A2

<400> 5

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de HepB S Ag

<400> 6

Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de gp100 wt ITDQVPFSV

<400> 7

Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de ovoalbumina

<400> 8

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de TRP2

<400> 9

Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
1 5

$\langle 210 \rangle \quad 10$

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Epítopo de GP100 de tipo selvagem/GP100210M

 $\langle 400 \rangle \quad 10$

Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5 10

<210> 11

 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Epítopo de GP100 F71

<400> 11

Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Ile Ser Val
1 5 10

<210> 12

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Epítipo de GP100 F7L

<400> 12

Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Leu Ser Val
1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de GP100 F7Y

<400> 13

Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo restringido por I-Ab/epítopo de HepB CD4

<400> 14

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
1 5 10

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de gp100 CD4 restringido por HLA-DR4

<400> 15

Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp
1 5 10 15

<210> 16

<211> 14

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Local enzimático seleccionado (Fsp 1) e sequência oligonucleotídica epitópica para CDR H1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(6)

<223> Sequência de ADN epitópica

<400> 16

nnnnnntggg ttcg 14

<210> 17

<211> 14

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Local enzimático seleccionado (Msc I) e sequência oligonucleotídica epitópica para CDR H2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(7)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 17

tnnnnnncga ttca 14

<210> 18

<211> 10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Local enzimático seleccionado (Srf I) e sequência
oligonucleotídica epitópica para CDR H3

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(8)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 18

gannnnnntg 10

<210> 19

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Local enzimático seleccionado (Eco RV) e sequência
oligonucleotídica epitópica para CDR L1

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(13)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 19

ctcttgcnnn nnntggt 17

<210> 20

<211> 12

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Local enzimático seleccionado (Ssp I) e sequência
oligonucleotídica epitópica para CDR L2

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(10)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 20

ctacnnnnnn ag 12

<210> 21

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Local enzimático seleccionado (Hpa I) e sequência
oligonucleotídica epitópica para CDR L3

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(15)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 21

tattactgcg nnnnnttcgg tggagg 26

<210> 22

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador H1

<400> 22

cctgagaatg tcctgctgcg caggctccgg ggaag 35

<210> 23

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador H2

<400> 23

cattggtagt ggtggccatt tccagagac 29

<210> 24

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador H3

<400> 24

ccgtgtatta ctgtgcccgg gccaaaggaac cacggtc 37

<210> 25

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador L1

<400> 25

ggagccagcc tcgatattctg cagaaaccag gc 32

<210> 26

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador L2

<400> 26

ccacagctcc taatattcag tggcagtgga tc 32

<210> 27

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador L3

<400> 27

gctgaggata ccggagttaa ccaaggtgga aat 33

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador huHeClonR

<400> 28

cgcctgagtt ccacgacacc 20

<210> 29

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador huLidonR

<400> 29

caggcacaca acagaggc 18

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador CMV Directo

<400> 30

ggcgtggata gcggtttgac 20

<210> 31

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador OrigstophuHeCH1 Dir

<400> 31

ccaaggtgga caagaaagtt tgacccaaatt cttgtgaca 39

<210> 32

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador origstophuHeCH1 Inv

<400> 32

gagttttgtc acaagatttg ggtcaaactt tcttgtccac cttgg 45

<210> 33

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador pOrig ligero sem líder Dir

<400> 33

aggatccacc atggatgtgt tgatgaccc 29

<210> 34

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador pOrig pesado sem líder Dir

<400> 34

aaagcttatg caggtgcagc tgggtg 25

<210> 35

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador huigG3Inv2#

<400> 35

atcgatatca ttacccgga gacagg 26

<210> 36

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador IgG3hudir2

<400> 36
actgtctcca gcgcttccac caag 24

<210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador IgG2 dir

<400> 37
agtcaccggt tccagcgctt ccac 24

<210> 38
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador IgG2 Inv

<400> 38
agtggatatt atttaccggg agacagg 27

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador HIBF

<400> 39

aacagtctga gggctgagga 20

<210> 40

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador huigG1PVA INV

<400> 40

agactgacgg tccccccgcg actggaggtg ctgg 34

<210> 41

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador HuigG2ELLGInv

<400> 41

agactgacgg tcctcctaac agttctggtg ctgg 34

<210> 42

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador SV40premDIR

<400> 42

agctagcatc agcacgtggt gacaattaat catc 34

<210> 43

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Sv40premInv

<400> 43

aacgattccg aagcccaacc ttcatag 28

<210> 44

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador migG2aClAfeIF2

<400> 44

tttacagcgc taaaacaaca gcccacatcg tc 32

<210> 45

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador migG2axbaRA

<400> 45

tctagatcat ttacccggag tccgggagaa gctc 34

<210> 46

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador MoLCIBsiF1

<400> 46

tttcgtacgg atgctgcacc aactgtatcc 30

<210> 47

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador MoLCxhoR1

<400> 47

tttctcgagt caacactcat tcctgttgaa gc 32

<210> 48

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador MOIgG2BamHI Dir

<400> 48

ccttgacctg gaactctggt tcctgtcca gtggtg 36

<210> 49

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador MoigG2BamHI Inv

<400> 49

caccactgga caggggaacca gagttccagg tcaagg 36

<210> 50

<211> 38

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador MoigG2XhoI Dir

<400> 50

gcagctcagt gactgtaact tcgagcacct ggcccagc 38

<210> 51

<211> 38

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador MoigG2xhoI Inv

<400> 51

gctggggccag gtgctcgaag ttacagtcac tgagctgc 38

<210> 52

<211> 59

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador wtkappavarL1Dir

<400> 52

ctcttgcaga tctagtcaga gcctggtaca tagtaatgga aacacctatt
tagaatggt 59

<210> 53

<211> 59

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador wtkappavarL1 Inv

<400> 53

accattctaa ataggtgttt ccattactat gtaccaggct ctgactagat
ctgcaagag 59

<210> 54

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador TRP2 Murino Directo

<400> 54

tttctaagct tatgggcctt gtgggatggg ggcttc 36

<210> 55

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador TRP2 Murino Reverso

<400> 55

tttctgatat ctcaggcttc ctccgtgtat ctcttgc 37

<210> 56

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador GP100 Directo

<400> 56

tttctgatat catgggtgtc cagagaagga gcttc 35

<210> 57

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Gp100 Reverso

<400> 57

tttctctcga gtcagacctg ctgtccactg aggagc 36

<210> 58

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador Fosforilado (exemplo de epítipo de TRP2)

<400> 58

tagtgtttat gatttttttg tgtggctccg attca 35

<210> 59

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítipo de auxiliar CD4 ou CTL CD8 (TRP2, A2 com restrição por HLA, Kb)

<400> 59

agtgtttatg atttttttgt gtggctc 27

<210> 60

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítipo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (GP100, A2 com restrição por HLA)

<400> 60

accattactg accaggtgcc tttctccgtg 30

<210> 61

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (GP100 (210M), A2 com restrição por HLA)

<400> 61

accattatgg accaggtgcc tttctccgtg 30

<210> 62

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (GP100 (F7L))

<400> 62

accattactg accaggtgcc ttgtccgtg 30

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de GP100 (F7L), A2 com restrição por HLA

<400> 63

Ile Thr Asp Gln Val Pro Leu Ser Val
1 5

<210> 64

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (GP100, DR0401 restrição por HLA)

<400> 64

tggaacaggc agctgtatcc agagtggaca gaagcccaga gacttgac 48

<210> 65

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (HEPB S AG, Kd(CTL) com restrição por HLA)

<400> 65

ataccgcaga gtctagactc gtggtggact tctctc 36

<210> 66

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (nucleoproteína Hep8, I-Ab com restrição por HLA (auxiliar))

<400> 66

actcctccag cttatagacc accaaatgcc cctatccta 39

<210> 67

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (MAGE3, A2 com restrição por HLA)

<400> 67

ttcctgtggg gtccaagggc cctcggtt 27

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (MAGE3, A2 com restrição por HLA)

<400> 68

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 69

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Tie2 (Z83), A2 com restrição por HLA)

<400> 69

ttcctaccag ctactttaac tatgact 27

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Tie2 (z83), A2 com restrição por HLA)

<400> 70

Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr
1 5

<210> 71

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Tie2 (z84), A2 com restrição por HLA)

<400> 71

ttcctaccag ctactttaac tatgggtt 27

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Tie2 (Z84), A2 com restrição por HLA)

<400> 72

Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Val
1 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Tie2 (z9), A2 com restrição por HLA)

<400> 73

gggatggtgg aaaagccctt caacatt 27

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Tie2 (29), A2 com restrição por HLA)

<400> 74

Gly Met Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile
1 5

<210> 75

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítipo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Tie2 (mZ9), A2 com restrição por HLA)

<400> 75

gggatggtgg aaaagccctt caacgtt 27

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítipo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Tie2 (mZ9), A2 com restrição por HLA)

<400> 76

Gly Met val Glu Lys Pro Phe Asn val
1 5

<210> 77

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítipo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (FLU HA, I-Ad com restrição por HLA (auxiliar))

<400> 77

tttgaaaggt ttgagatatt cccaaggaa 30

<210> 78

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítoto de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (ovoalbumina, Kb com restrição por HLA)

<400> 78

agtataatca actttgaaaa actg 24

<210> 79

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítoto de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Triosefosfato isomerase (wt), DR0101 com restrição por HLA)

<400> 79

ggggagctca tcggcattct gaacgcggcc aaggtgccgg ccgac 45

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Triosefosfato isomerase (wt), DR0101 com restrição por HLA)

<400> 80

Gly Glu Leu Ile Gly Thr Leu Asn Ala Ala Lys Val Pro Ala Asp
1 5 10 15

<210> 81

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Triosefosfato isomerase (mI), DR0101 com restrição por HLA)

<400> 81

ggggagctca tcggcactct gaacgcggcc aaggtgccgg ccgac 45

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (Triosefosfato isomerase (mI), DR0101 com restrição por HLA)

<400> 82

Gly Glu Leu Ile Gly Ile Leu Asn Ala Ala Lys Val Pro Ala Asp
1 5 10 15

<210> 83

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (VEGFR2, A2 com restrição por HLA)

<400> 83

gtgattgccca tgttcttctg gctactt 27

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (VEGFR2, A2 com restrição por HLA)

<400> 84

Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu
1 5

<210> 85

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (mVEGFR2, A2 com restrição por HLA)

<400> 85

gtgcttgcca tggttcttct ggctactt 28

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Auxiliar CD4 ou CTL CD8 (mVEGFR2, A2 com restrição por HLA)

<400> 86

Val Leu Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu
1 5

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de Gp100 v5L

<400> 87

Thr Ile Thr Asp Gln Leu Pro Phe Ser Val
1 5 10

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL restringido por HLA-A*0201 predito de Tie-2 (Z282)

<400> 88

Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val
1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL restringido por HLA-A*0201 predito de Tie-2 (Z283)

<400> 89

Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val
1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL restringido por HLA-A*0201 predito de Tie-2 (z284)

<400> 90

Leu Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu
1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL restringido por HLA-A*0201 predito de Tie-2 (z285)

<400> 91

Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL restringido por HLA-A*0201 predito de Tie-2 (z286)

<400> 92

Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL restringido por HLA-A*0201 predito de Tie-2 (z287)

<400> 93

Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu
1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de CTL restringido por HLA-A*0201 predito de Tie-2 (Z18)

<400> 94

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido restringido por HLA-A2 derivado de VEGFR2

<400> 95

Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu
1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptidos hTERT modificados

<400> 96

Tyr Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val
1 5

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptidos hTERT modificados

<400> 97

Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val
1 5 10

<210> 98

<211> 1489

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Cadeia pesada quimérica de immunobody

<400> 98

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggtccctg    120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc      180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtgggtg tgatagaacc      240
tactatccag aactgtgaa gggccgattc accatttcca gagacaatag caagaacacc      300
ctgtatttgc aattgaacag tctgagggtc gaggacacag ccgtgtatta ctgtgcaaga      360
cattatgggtc actacgtgga ctatgctgtg gactactggg gtcaaggaac caccgtcacc      420
gtctccagcg cttccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc      480
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg    540
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta      600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc      660
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa      720
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc      780
ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc      840
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag      900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag      960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg    1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa    1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc      1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc    1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg    1260
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag    1320

agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac    1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gatctaaagg gcgaattcgc    1440
ccttaagggc gaattttgca gatatccatc aactggcgg ccgctcgag      1489

```

<210> 99

<211> 467

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Cadeia pesada quimérica de immunobody

<400> 99

```

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

```

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465

<210> 100
 <211> 732
 <212> ADN
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> Cadeia capa quimérica de immunobody

<400> 100

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta      180
gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac      240
cgattttctg ggggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga ttccacactc      300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgctttca aggttcacat      360
gttccgtgga cgttcggtgg aggcaccaag gtggaaatca agcgtacggt agcggcccca      420
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttggtg      480
tgcttctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc      540
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac      600
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc      660
tgcgaagtca cccaccaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag      720
tgttgactcg ag                                         732

```

<210> 101
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> Cadeia capa quimérica de immunobody

<400> 101

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 102

<211> 376

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody (H1)

<400> 102

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactcccag	60
gtgcagctgg tggagactgg gggaggctta atccagcctg gagggtcctt gagaatgtcc	120
tgcgcaggct ccggggaagg ggctggagtg gatcgcatat attggtagtg gtggtgatag	180
aacctactat ccagacactg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca atagcaagaa	240
caccctgtat ttgcaattga acagtctgag ggctgaggac acagccgtgt attactgtgc	300
aagacattat ggtcactacg tggactatgc tgtggactac tgggggtcaag gtaccacggt	360
caccgtctcc agcgct	376

<210> 103

<211> 125

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody (H1)

<400> 103

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro
 50 55 60
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125

<210> 104

<211> 382

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody (H2)

<400> 104

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactcccag	60
gtgcagctgg tggagactgg gggaggctta atccagcctg gagggtcctt gagaatgtcc	120
tgtgcagcct ctggattcgc tttcaatacc tatgacatgt cttgggttcg ccaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggt gccatttcca gagacaatag	240
caagaacacc ctgtatttgc aattgaacag tctgagggtg gaggacacag ccgtgtatta	300
ctgtgcaaga cattatggtc actacgtgga ctatgctgtg gactactggg gtcaagggtac	360
cacggtcacc gtctccagcg ct	382

<210> 105

<211> 126

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody (H2)

<400> 105

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 65 70 75 80
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125

<210> 106

<211> 383

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody (H3)

<400> 106

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactcccag	60
gtgcagctgg tggagactgg gggaggctta atccagcctg gagggtcctt gagaatgtcc	120
tgtgcagcct ctggattcgc tttcaatacc tatgacatgt cttgggttcg ccaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtggtg gtgatagaac ctactatcca	240
gacactgtga agggccgatt caccatttcc agagacaata gcaagaacac cctgtatttg	300
caattgaaca gtctgagggc tgaggacaca gccgtgtatt actgtgcccc ggccaaggta	360
ccacggtcac cgtctccagc gct	383

<210> 107

<211> 127

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody (H3)

<400> 107

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125

<210> 108

<211> 335

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody
(H1/H2)

<400> 108

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactcccag      60
gtgcagctgg tggagactgg gggaggctta atccagcctg gagggtcctt gagaatgtcc      120
tgcgcaggct ccggggaagg ggctggagtg gatcgcatatc attggtagtg gtggccattt      180
ccagagacaa tagcaagaac accctgtatt tgcaattgaa cagtctgagg gctgaggaca      240
cagccgtgta ttactgtgca agacattatg gtcactacgt ggactatgct gtggactact      300
gggggtcaagg taccacgggc accgtctcca gcgct                                335

```

<210> 109

<211> 110

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody
(H1/H2)

<400> 109

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1          5          10
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
          20          25          30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
          35          40          45
Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
          50          55          60
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
          65          70          75          80
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val
          85          90          95
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
          100          105          110

```


<210> 110

<211> 336

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody
(H1/H3)

<400> 110

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactcccag	60
gtgcagctgg tggagactgg gggaggctta atccagcctg gaggggtccct gagaatgtcc	120
tgcgcaggct ccggggaagg ggctggagtg gatcgcatatc attggtagtg gtggtgatag	180
aacctactat ccagacactg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca atagcaagaa	240
caccctgtat ttgcaattga acagtctgag ggctgaggac acagccgtgt attactgtgc	300
ccggggccaag gtaccacggt caccgtctcc agcgct	336

<210> 111

<211> 111

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody
(H1/H3)

<400> 111

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro
 50 55 60
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 100 105 110

<210> 112

<211> 342

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody
 (H2/H3)

<400> 112

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactcccag	60
gtgcagctgg tggagactgg gggaggctta atccagcctg gagggtcct gagaatgtcc	120
tgtgcagcct ctggattcgc ttcaataacc tatgacatgt cttgggttcg ccaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtggtg gccatttcca gagacaatag	240
caagaacacc ctgtatttgc aattgaacag tctgagggct gaggacacag ccgtgtatta	300
ctgtgccccg gccaaaggta caccggtcacc gtctccagcg ct	342

<210> 113

<211> 112

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody
(H2/H3)

<400> 113

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
35 40 45

Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
65 70 75 80

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
100 105 110

<210> 114

<211> 295

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody
(H1/H2/H3)

<400> 114

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactcccag	60
gtgcagctgg tggagactgg gggaggctta atccagcctg gagggtcctt gagaatgtcc	120
tgcgaggctt cgggggaagg ggctggagtg gatcgcatatc attggtagtg gtggccattt	180
ccagagacaa tagcaagaac accctgtatt tgcaattgaa cagtctgagg gctgaggaca	240
cagccgtgta ttactgtgcc cgggccaagg taccacggtc accgtctcca gcgct	295

<210> 115

<211> 96

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia pesada de immunobody
(H1/H2/H3)

<400> 115

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

<210> 116

<211> 340
 <212> ADN
 <213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L1)

<400> 116

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactccgat	60
gtgttgatga cccaatctcc actctccctg cctgtcactc ctggggagcc agcctcgata	120
tctgcagaaa ccaggccagt ctccacagct cctgatctac aaagtttcca accgattttc	180
tgggggtccca gacagattca gtggcagtgg atcagggaca gatttcacac tcaagatcag	240
cagagtggag gctgaggata ccggagtgtg ttactgcttt caagggtcac atgttccgtg	300
gacgttcggt ggaggcacca aggtggaaat caagcgtacg	340

<210> 117
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L1)

<400> 117

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His
 85 90 95
 Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 118

<211> 360

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L2)

<400> 118

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccaactccgat	60
gtgttgatga cccaatctcc actctccctg cctgtcactc ctggggagcc agcctccatc	120
tcttgcagat ctagtcagag cctggtacat agtaatggaa acacctatrrt agaatggtac	180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctaatatcca gtggcagtgg atcagggaca	240
gatttcacac tcaagatcag cagagtggag gctgaggata ccggagtgtg ttactgcttt	300
caagggttcac atgttccgtg gacgttcggt ggaggcacca aggtggaaat caagcgtacg	360

<210> 119

<211> 117

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L2)

<400> 119

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1          5          10          15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20          25          30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
          35          40          45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50          55          60

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

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr
          85          90          95

Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
          100          105          110

Lys Val Glu Ile Lys
          115

```

<210> 120

<211> 352

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L3)

<400> 120

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactccgat	60
gtgttgatga cccaatctcc actctccctg cctgtcactc ctggggagcc agcctccatc	120
tcttgagat ctagtcagag cctggtacat agtaatggaa acacctatctt agaatggtac	180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240
ggggtcccag acagattcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc	300
agagtggagg ctgaggatac cggagttaac caaggtggaa atcaagcgta cg	352

<210> 121

<211> 115

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L3)

<400> 121

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Thr Lys Val
 100 105 110
 Glu Ile Lys
 115

<210> 122

<211> 301

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L1/L3)

<400> 122

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactccgat	60
gtgttgatga cccaatctcc actctccctg cctgtcactc ctggggagcc agcctcgata	120
tctgcagaaa ccaggccagt ctccacagct cctaattattc agtggcagtg gatcagggac	180
agatttcaca ctcaagatca gcagagtgga ggctgaggat accggagtgt attactgctt	240
tcaaggttca catgttccgt ggacgttcgg tggaggcacc aaggtggaaa tcaagcgta	300
g	301

<210> 123

<211> 96

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L1/L3)

<400> 123

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln
35 40 45

Leu Leu Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
50 55 60

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

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
85 90 95

<210> 124

<211> 313

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L2/L3)

<400> 124

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactccgat    60
gtgttgatga cccaatctcc actctccctg cctgtcactc ctggggagcc agcctccatc    120
tcttgcagat ctagtcagag cctggtacat agtaatggaa acacctattt agaatggtac    180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctaatattca gtggcagtgg atcagggaca    240
gatttcacac tcaagatcag cagagtggag gctgaggata ccggagttaa ccaaggtgga    300
aatcaagcgt acg                                                         313

```

<210> 125

<211> 101

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L2/L3)

<400> 125

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

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

<210> 126

<211> 254

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody
(L1/L2/L3)

<400> 126

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactccgat    60
gtgttgatga cccaatctcc actctccctg cctgtcactc ctggggagcc agcctcgata    120
tctgcagaaa ccaggccagt ctccacagct cctaattatc agtggcagtg gatcagggac    180
agatttcaca ctcaagatca gcagagtgga ggctgaggat accggagtta accaagggtgg    240
aatcaagcg tacg                                     254

```

<210> 127

<211> 80

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody
(L1/L2/L3)

<400> 127

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln
 35 40 45

Leu Leu Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 50 55 60

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65 70 75 80

<210> 128

<211> 293

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L1/L3)

<400> 128

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggagt ccactccgat	60
gtgttgatga cccaatctcc actctccctg cctgtcactc ctggggagcc agcctcgata	120
tctgcagaaa ccaggccagt ctccacagct cctgatctac aaagtttcca accgattttc	180
tgggggtcca gacagattca gtggcagtgg atcagggaca gatttcacac tcaagatcag	240
cagagtggag gctgaggata ccggagttaa ccaaggtgga aatcaagcgt acg	293

<210> 129

<211> 94

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável da cadeia capa de immunobody (L1/L3)

<400> 129

```

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

```

<210> 130

<211> 720

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Cadeia pesada de immunobody IB15

<400> 130

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggtccctg	120
agaatgtcct gcaccattat ggaccaggtg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtagtggtta tgattttttt	240
gtgtggctcc gattcaccat ttccagagac aatagcaaga acaccctgta tttgcaattg	300
aacagtctga gggctgagga cacagccgtg tattactgtg cgagacatta tggtcactac	360
gtggactatg ctgtggacta ctgggggtcaa ggtaccacgg tcaccgtctc cagcgcttcc	420
accaagggcc catcggctct ccccttgga cccctctcca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggcccttg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagtgtg acccaaattc	720

<210> 131

<211> 236

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Cadeia pesada de immunobody IB15

<400> 131

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Met Asp Gln Val Pro
 35 40 45
 Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 85 90 95
 Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105 110
 His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Pro Lys Ser
 225 230 235

<210> 132
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> Região variável pesada de DCIB15 sem um líder (cadeia pesada)

<400> 132

aagcttacca tgcaggtgca gctggtggag actgggggag gcttaatcca gcctggaggg	60
tccctgagaa tgtcctgcac cattatggac caggtgcctt tctccgtgtg gggtcggcag	120
gctccgggga aggggctgga gtggatcgca tacattggta gtggtggtag tgtttatgat	180
ttttttgtgt ggctccgatt caccatttcc agagacaata gcaagaacac cctgtatttg	240
caattgaaca gtctgagggc tgaggacaca gccgtgtatt actgtgcgag acattatggt	300
cactacgtgg actatgctgt ggactactgg ggtcaaggta ccacgggtcac cgtctccagc	360
gct	363

<210> 133
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Desconhecido
 <220>

<223> Região variável pesada de DCIB15 sem um líder (cadeia pesada)

<400> 133

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

Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser
 20 25 30

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

Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu Arg Phe
 50 55 60

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

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

Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 134

<211> 345

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável capa de DCIB15 sem um líder (cadeia leve)

<400> 134

```

ggatccacca tggatgtgtt gatgacccaa tctccactct ccttgctgt cactcctggg      60
gagccagcct ccattctcttg cactcctcca gcttatagac caccaaagtc ccttatccta    120
tggatatctgc agaaaccagg ccagtctcca cagctcctga tctacaaagt ttccaaccga    180
ttttctgggg tcccagacag attcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag    240
atcagcagag tggaggctga ggataccgga gtgtattact gctttcaagg ttcacatgtt    300
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagggtg gaaatcaagc gtacg                    345

```

<210> 135

<211> 110

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Região variável capa de DCIB15 sem um líder (cadeia leve)

<400> 135

```

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

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro
          20          25          30

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

Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
 50          55          60

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

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

Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105          110

```

<210> 136
 <211> 857
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 136
 agcgcttcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 60
 gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 120
 tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 180
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcaactt cggcaccag 240
 acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag 300
 cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc 360
 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 480
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc 540
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaacaaa 660
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 720
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac ctaagggcga attctgcaga tatccagcac 840
 agtggcggcc gctcgag 857

<210> 137
 <211> 654
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 137

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

Arg Ser Thr Ser₂₀ Glu Ser Thr Ala Ala₂₅ Leu Gly Cys Leu Val₃₀ Lys Asp
 Tyr Phe Pro₃₅ Glu Pro Val Thr Val₄₀ Ser Trp Asn Ser Gly₄₅ Ala Leu Thr
 Ser Gly₅₀ Val His Thr Phe Pro₅₅ Ala Val Leu Gln Ser₆₀ Ser Gly Leu Tyr
 Ser Leu Ser Ser Val₇₀ Thr Val Pro Ser Ser₇₅ Asn Phe Gly Thr Gln₈₀
 Thr Tyr Thr Cys Asn₈₅ Val Asp His Lys Pro₉₀ Ser Asn Thr Lys Val₉₅ Asp
 Lys Thr Val Glu₁₀₀ Arg Lys Cys Cys Val₁₀₅ Glu Cys Pro Pro Cys₁₁₀ Pro Ala
 Pro Pro Val₁₁₅ Ala Gly Pro Ser Val₁₂₀ Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 Asp Thr₁₃₀ Leu Met Ile Ser Arg₁₃₅ Thr Pro Glu Val Thr₁₄₀ Cys Val Val Val
 Asp Val₁₄₅ Ser His Glu Asp₁₅₀ Pro Glu Val Gln Phe₁₅₅ Asn Trp Tyr Val Asp₁₆₀
 Gly Val Glu Val His₁₆₅ Asn Ala Lys Thr Lys₁₇₀ Pro Arg Glu Glu Gln₁₇₅ Phe
 Asn Ser Thr Phe₁₈₀ Arg Val Val Ser Val₁₈₅ Leu Thr Val Val His₁₉₀ Gln Asp
 Trp Leu Asn₁₉₅ Gly Lys Glu Tyr Lys₂₀₀ Cys Lys Val Ser Asn₂₀₅ Lys Gly Leu
 Pro Ala₂₁₀ Pro Ile Glu Lys Thr₂₁₅ Ile Ser Lys Thr Lys₂₂₀ Gly Gln Pro Arg
 Glu₂₂₅ Pro Gln Val Tyr Thr₂₃₀ Leu Pro Pro Ser Arg₂₃₅ Glu Glu Met Thr Lys₂₄₀
 Asn Gln Val Ser₂₄₅ Leu Thr Cys Leu Val Lys₂₅₀ Gly Phe Tyr Pro Ser₂₅₅ Asp
 Ile Ala Val Glu₂₆₀ Trp Glu Ser Asn Gly₂₆₅ Gln Pro Glu Asn Asn₂₇₀ Tyr Lys
 Thr Thr Pro₂₇₅ Pro Met Leu Asp Ser₂₈₀ Asp Gly Ser Phe Phe₂₈₅ Leu Tyr Ser

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 325 330 335
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 340 345 350
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 355 360 365
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 370 375 380
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 405 410 415
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 420 425 430
 Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 435 440 445
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 450 455 460
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 465 470 475 480
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 485 490 495
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 500 505 510
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 515 520 525
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 530 535 540
 Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 545 550 555 560

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
565 570 575

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
580 585 590

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
595 600 605

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
610 615 620

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
625 630 635 640

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
645 650

<210> 138

$\langle 211 \rangle$ 1164

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 138

agcgcttcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctct	60
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	120
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc	180
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag	240
acctacacct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag	300
ctcaaaaccc cacttggtga cacaactcac acatgccac ggtgcccaga gcccaaatct	360
tgtgacacac ctccccctg cccacggtgc ccagagccca aatcttgtga cacacctccc	420
ccatgccac ggtgcccaga gcccaaatct tgtgacacac ctccccatg cccacggtgc	480
ccagcacctg aactcctggg aggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggat	540
acccttatga tttcccgac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa	600
gaccccgagg tccagttcaa gtggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	660
aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	720
caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca	780
gccccatcg agaaaacat ctccaaaacc aaaggacagc cccgagaacc acaggtgtac	840
accctgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc	900
aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcagcgggca gccggagaac	960
aactacaaca ccacgcctcc catgctggac tccgacggct cttcttctct ctacagcaag	1020
ctcacctgtg acaagagcag gtggcagcag gggaacatct tctcatgctc cgtgatgcat	1080
gaggctctgc acaaccgctt cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgatat	1140
ccatcacact ggcggccgct cgag	1164

<210> 139

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

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

225						230						235						240
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 245	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 250	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 255	Lys			
Ala	Leu	Pro	Ala 260	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 265	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys 270	Gly	Gln			
Pro	Arg	Glu 275	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 280	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 285	Glu	Glu	Met			
Thr	Lys 290	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 295	Thr	Cys	Leu	Val	Lys 300	Gly	Phe	Tyr	Pro			
Ser 305	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 310	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly 315	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 320			
Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro 325	Pro	Met	Leu	Asp	Ser 330	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 335	Leu			
Tyr	Ser	Lys	Leu 340	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 345	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 350	Asn	Ile			
Phe	Ser	Cys 355	Ser	Val	Met	His	Glu 360	Ala	Leu	His	Asn	Arg 365	Phe	Thr	Gln			
Lys	Ser 370	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 375	Gly	Lys										

$\langle 210 \rangle$ 140

 $\langle 211 \rangle$ 1440

<212> ADN

<213> Desconhecido

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cadeia pesada de DCIB66

$\langle 400 \rangle$ 140

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggccctg	120
agaatgtcct gcaccattat ggaccaggtg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtagtgttta tgattttttt	240
gtgtggctcc gattcaccat ttccagagac aatagcaaga acaccctgta tttgcaattg	300
aacagtctga gggctgagga cacagccgtg tattactgtg cgagacatta tggctactac	360
gtggactatg ctgtggacta ctgggggtcaa ggtaccacgg tcaccgtctc cagcgttcc	420
accaagggcc catcgttctt cccctggca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccggtg tcctacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaattc	720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctc cagtcgcggg gggaccgtca	780
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1020
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag	1380
agcctctccc tgtctccggg taaatgatct aaagggcgaa ttcgccctta agggcgaatt	1440

<210> 141

<211> 465

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Cadeia pesada de DCIB66

<400> 141

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Met Asp Gln Val Pro
 35 40 45
 Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 85 90 95
 Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105 110
 His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

115					120					125					
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	130					135					140				
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
145					150					155					160
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
				165					170					175	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
			180					185					190		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
		195					200					205			
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
	210					215					220				
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
225					230					235					240
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Gly	Pro
				245					250					255	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			260					265					270		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
		275					280					285			
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
	290					295					300				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
305					310					315					320
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
				325					330					335	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
			340					345					350		
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
		355					360					365			
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
	370					375					380				
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu

385		390		395		400									
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
				405					410					415	
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
			420					425					430		
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
		435					440					445			
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	450					455					460				
Lys															
465															

<210> 142

<211> 1440

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Cadeia pesada de DCIB67 que contém motivo de união a
G1

<400> 142

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggg ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggccctg	120
agaatgtcct gcaccattat ggaccagggtg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtagtgttta tgattttttt	240
gtgtggctcc gattcaccat ttccagagac aatagcaaga acaccctgta tttgcaattg	300
aacagtctga gggctgagga cacagccgtg tattactgtg cgagacatta tggtcactac	360
gtggactatg ctgtggacta ctgggggtcaa ggtaccacgg tcaccgtctc cagcgcttcc	420
accaagggcc catcgggtctt cccctggcg ccctgtcca ggagcacctc cgagagcaca	480
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac	540
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc	660
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agacagttga gcgcaaattg	720
tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca gaactgttag gaggaccgtc agtcttcctc	780
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggg cacgtgcgtg	840
gtgggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg	900
gagggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg	960
gtcagcgtcc tcaccgtcgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag	1020
gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag	1080
ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccatcccggtg aggagatgac caagaaccag	1140
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag	1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc	1260
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1380
ctgtctccgg gtaaattgata tccactaagg gcgaattctg cagatatcca gcacagtggc	1440

<210> 143

<211> 462

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Cadeia pesada de DCIB67 que contém motivo de união a G1

<400> 143

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Met Asp Gln Val Pro
35 40 45

Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
50 55 60

Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
65 70 75 80

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
85 90 95

Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
100 105 110

His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

180							185					190				
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
		195					200					205				
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	
	210					215					220					
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	
225					230					235					240	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
				245					250					255		
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
			260					265					270			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
		275					280					285				
Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
	290					295					300					
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	
305					310					315					320	
Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
				325					330					335		
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
			340					345					350			
Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
		355					360					365				
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
	370					375					380					
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
385					390					395					400	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	
				405					410					415		
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
			420					425					430			
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
		435					440					445				
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			

450

455

460

<210> 144

<211> 417

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada)

<400> 144

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg	120
agaatgtcct gcaccattat ggaccaggtg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtggtg gtagtgttta tgattttttt	240
gtgtggctcc gattcaccat ttccagagac aatagcaaga acaccctgta tttgcaattg	300
aacagtctga gggctgagga cacagccgtg tattactgtg cgagacatta tggtcactac	360
gtggactatg ctgtggacta ctgggggtcaa ggtaccacgg tcaccgtctc cagcgct	417

<210> 145

<211> 135

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig

<400> 145

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Met Asp Gln Val Pro
 35 40 45
 Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 85 90 95
 Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105 110
 His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 146

<211> 309

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCorig (variável leve)

<400> 146

```

ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat      60
agaccaccaa atgcccctat cctatgggat ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc      120
ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct ggggtcccag acagattcag tggcagtgga      180
tcagggacag atttcacact caagatcagc agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat      240
tactgctttc aaggttcaca tgttccgtgg acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc      300
aagcgtacg                                     309

```

<210> 147

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDcorig (variável leve)

<400> 147

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 148

<211> 422

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCorig (variável pesada) (sequência de DCIB24)

<400> 148

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg      120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc      180
aggctccggg gaaggggctg gagtggatcg catacattgg tagtggtggt agtataatca      240
actttgaaaa actgcgattc accatttcca gagacaatag caagaacacc ctgtatttgc      300
aattgaacag tctgagggct gaggacacag ccgtgtatta ctgtgcaaga cattatggtc      360
actacgtgga ctatgctgtg gactactggg gtcaaggaac cacggtcacc gtctccagcg      420
ct                                                                    422

```

<210> 149

<211> 137

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDcorig (variável pesada) (sequência de DCIB24)

<400> 149

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe Glu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 85 90 95
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 150

<211> 398

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDcorig (variável leve) (sequência de DCIB24)

<400> 150

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccttat cctatggtat      180
tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac cgattttctg      240
gggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga ttccacactc aagatcagca      300
gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgctttca aggttcacat gttccgtgga      360
cgttcggtgg aggcaccaag gtggaaatca agcgtacg                                398

```

<210> 151

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB24)

<400> 151

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 152

<211> 417

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável pesada) (sequência de DCIB25)

<400> 152

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg      120
agaatgtcct gcaccattat ggaccagggt cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg      180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggt gtagtggtta tgattttttt      240
gtgtggctcc gattcaccat ttccagagac aatagcaaga acaccctgta ttgcaattg      300
aacagtctga gggctgagga cacagccgtg tattactgtg cgagacatta tggtcactac      360
gtggactatg ctgtggacta ctgggggtcaa ggtaccacgg tcaccgtctc cagcgct      417

```

<210> 153

<211> 420

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB25)

<400> 153

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120

gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta      180
gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac      240
cgattttctg ggggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga ttccacactc      300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgcactcc tccagcttat      360
agaccaccaa atgcccttat cctattcggt ggaggcacca aggtggaaat caagcgtacg      420

```

<210> 154

<211> 135

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCorig (variável leve) (sequência de DCIB25)

<400> 154

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1          5          10          15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20          25          30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
          35          40          45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50          55          60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65          70          75          80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85          90          95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
          100          105          110

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Phe Gly Gly
          115          120          125

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          130          135

```

<210> 155

<211> 135

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCorig (variável pesada) (sequência de DCIB25)

<400> 155

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Phe Gly Gly
115 120 125

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
130 135

<210> 156

<211> 423

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões

constantes capa e Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCorig (variável pesada) (sequência de DCIB31)

<400> 156

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggtccctg     120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc      180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtggtgg tgatagaacc      240
tactatccag acactgtgaa gggccgattc accatttcca gagacaatag caagaacacc      300
ctgtatttgc aattgaacag tctgagggct gaggacacag ccgtgtatta ctgtgcccga      360
agtgtttatg atttttttgt gtggctctgg ggccaaggaa ccacggtcac cgtctccagc      420

gct                                                                 423

```

<210> 157

<211> 137

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCorig (variável pesada) (sequência de DCIB31)

<400> 157

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 158

<211> 407

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DC1831)

<400> 158

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta      180
gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac      240
cgattttctg ggggtcccaga cagattcagt gcagtggatc agggacagat ttcacactca      300
agatcagcag agtggaggct gaggataccg gagtgtatta ctgctttcaa ggttcacatg      360
ttccgtggac gttcgggtgga ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacg                    407

```

<210> 159

<211> 131

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB31)

<400> 159

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

<210> 160

<211> 423

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável pesada) (sequência de DCIB32)

<400> 160


```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg      120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc      180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtggtgg tgatagaacc      240
tactatccag acactgtgaa gggccgattc accatttcca gagacaatag caagaacacc      300
ctgtatttgc aattgaacag tctgagggct gaggacacag ccgtgtatta ctgtgcccga      360
agtgtttatg atttttttgt gtggctctgg ggccaaggaa ccacggtcac cgtctccagc      420
gct                                     423

```

<210> 161

<211> 137

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (Sequência de DCIB32)

<400> 161

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 162

<211> 420

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB32)

<400> 162

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta      180
gaatgggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac      240
cgattttctg ggggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga tttcacactc      300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgcactcc tccagcttat      360
agaccaccaa atgccctat cctattcggg ggaggcacca aggtggaaat caagcgtacg      420

```

<210> 163

<211> 432

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pocorig (variável pesada) (sequência de DCIB36)

<400> 163

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggg ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg      120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc      180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtgggtg tgatagaacc      240
tactatccag acactgtgaa gggccgattc accatttcca gagacaatag caagaacacc      300
ctgtatttgc aattgaacag tctgagggct gaggacacag ccgtgtatta ctgtgcaaga      360
cattatgggtc actacgtgga ctatgctgtg gactactggg gtcaaggaa caccggtcacc      420
gtctccagcg ct                                     432

```

<210> 164

<211> 140

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (Sequência de DCIB36)

<400> 164

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1           5           10           15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
          20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
          35           40           45

Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50           55           60

Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro
65           70           75           80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          85           90           95

Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp
          115          120          125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          130          135          140

```

<210> 165

<211> 408

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDcorig (variável leve) (sequência de DCIB36)

<400> 165

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta	180
gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac	240
cgattttctg ggggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga ttccacactc	300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgcagtgt ttatgatttt	360
tttgtgtggc tcttcggtgg aggcaccaag gtggaaatca agcgtacg	408

<210> 166

<211> 131

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (Sequência de DCIB36)

<400> 166

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

<210> 167

<211> 438

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável pesada) (Sequência de DCIB48)

<400> 167

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg      120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgct ttgggttcgc      180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtggtgg tagtgtttat      240
gatttttttg tgtggctccg attcaccatt tccagagaca atagcaagaa caccctgtat      300
ttgcaattga acagtctgag ggctgaggac acagccgtgt attactgtgc ccgatggaac      360
aggcagctgt atccagagtg gacagaagcc cagagacttg actggggcca aggaaccacg      420
gtcaccgtct ccagcgct                                     438

```

<210> 168

<211> 142

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (Sequência de DCIB48)

<400> 168

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe
 65 70 75 80
 Val Trp Leu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 85 90 95
 Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Ala Arg Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln
 115 120 125
 Arg Leu Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 169

<211> 317

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB48)

<400> 169


```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta      180
gcagtggatc agggacagat ttcacactca agatcagcag agtggaggct gaggataccg      240
gagtgtatta ctgctttcaa ggttcacatg ttccgtggac gttcggtgga ggcaccaagg      300
tggaatcaa gcgtacg                                     317

```

<210> 170

<211> 435

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (sequência de DCIB49)

<400> 170

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggctccctg      120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc      180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtgggtg tgatagaacc      240
tactatccag acactgtgaa gggccgattc accatttcca gagacaatag caagaacacc      300
ctgtatttgc aattgaacag tctgagggct gaggacacag ccgtgtatta ctgtgcccga      360
actcctccag cttatagacc accaaatgcc cctatcctat ggggccaagg aaccacggtc      420
accgtctcca gcgct                                     435

```

<210> 171

<211> 141

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (Sequência de DCIB49)

<400> 171

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1      5      10      15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
20     25     30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
35     40     45
Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50     55     60
Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro
65     70     75     80
Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85     90     95
Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100    105    110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro
115    120    125
Ile Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130    135    140

```

<210> 172

<211> 408

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (Sequência de DCIB49)

<400> 172

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta	180
gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac	240
cgattttctg ggggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga ttccacactc	300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgctttca aggttcacat	360
gttccgtgga cgttcggtgg aggcaccaag gtggaaatca agcgtacg	408

<210> 173

<211> 429

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (sequência de DCIB52)

<400> 173

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg	120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc	180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtggtgg tagtgtttat	240
gatttttttg tgtggctccg attcaccatt tccagagaca atagcaagaa caccctgtat	300
ttgcaattga acagtctgag ggctgaggac acagccgtgt attactgtgc ccgaactcct	360
ccagcttata gaccaccaa tgcccctatc ctatggggcc aaggaaccac ggtcaccgtc	420
tccagcgct	429

<210> 174

<211> 139

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (sequência de DCIB52)

<400> 174

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe
 65 70 75 80
 Val Trp Leu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 85 90 95
 Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Ala Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 175

<211> 407

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB52)

<400> 175

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctatttg      180
aatggtacct gcagaaacca ggccagtctc cacagctcct gatctacaaa gtttccaacc      240
gattttctgg ggtcccagac agattcagtg gcagtggatc agggacagat ttcacactca      300
agatcagcag agtggaggct gaggataccg gagtgtatta ctgctttcaa ggttcacatg      360
ttccgtggac gttcgggtgga ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacg                    407

```

<210> 176

<211> 453

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (sequência de DCIB54)

<400> 176

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggg ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggccctg      120
agaatgtcct gcgggacagg cagggcaatg ctgggcacac acaccatgga agtaactgtc      180
taccattggg ttcggcaggc tccggggaag gggctggagt ggatcgcata cattggtagt      240
ggtggtagtg tttatgattt ttttgtgtgg ctccgattca ccatttccag agacaatagc      300
aagaacaccc tgtattttgca attgaacagt ctgagggctg aggacacagc cgtgtattac      360
tgtgcccgat ggaacaggca gctgtatcca gagtggacag aagcccagag acttgactgg      420
ggccaaggta ccacggtcac cgtctccagc gct                                453

```

<210> 177

<211> 147

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (sequência de DCIB54)

<400> 177

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1           5           10           15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
          20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Gly Thr Gly Arg Ala Met Leu
          35           40           45

Gly Thr His Thr Met Glu Val Thr Val Tyr His Trp Val Arg Gln Ala
 50           55           60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser
65           70           75           80

Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
          85           90           95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
          100          105          110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu
          115          120          125

Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
130          135          140

Val Ser Ser
145

```

<210> 178

<211> 131

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB52)

<400> 178

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1           5           10           15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20           25           30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
          35           40           45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50           55           60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65           70           75           80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

                        85                90                95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
          100           105           110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
          115           120           125

Glu Ile Lys
 130

```

<210> 179

<211> 408

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB54)

<400> 179

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta	180
gaatgggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac	240
cgattttctg ggggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga ttccacactc	300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgctttca aggttcacat	360
gttccgtgga cgttcggtgg aggcaccaag gtggaaatca agcgtacg	408

<210> 180

<211> 131

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB54)

<400> 180

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50

55

60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 115 120 125

Glu Ile Lys
 130

<210> 181

<211> 426

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (sequência de DCIB18)

<400> 181

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggccctg	120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc	180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtgggtg tagtgtttat	240
gatttttttg tgtggctccg attcaccatt tccagagaca atagcaagaa caccctgtat	300
ttgcaattga acagtctgag ggctgaggac acagccgtgt attactgtgc aagacattat	360
ggtcactacg tggactatgc tgtggactac tggggtaag gaaccacggt caccgtctcc	420
agcgct	426

<210> 182

<211> 138

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável pesada) (sequência de DCIB18)

<400> 182

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe
 65 70 75 80
 Val Trp Leu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 85 90 95
 Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 183

<211> 398

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB18)

<400> 183

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctcgatct cttgcaactc tccagcttat agaccaccaa atgcccctat cctatggtat      180
tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac cgattttctg      240
gggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga tttcacactc aagatcagca      300
gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgctttca aggttcacat gttccgtgga      360
cgttcggtgg aggcaccaag gtggaaatca agcgtacg                                398

```

<210> 184

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB18)

<400> 184

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 185

<211> 135

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB32)

<400> 185

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Phe Gly Gly
 115 120 125
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 130 135

<210> 186

<211> 131

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB48)

<400> 186

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

<210> 187

<211> 131

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de nucleótidos e aminoácidos das regiões
 variáveis pesadas e leves clonadas *in frame* com as regiões
 constantes capa Fc de IgG1 humana dentro do vector de
 expressão pDCOrig (variável leve) (sequência de DCIB49)

<400> 187

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

<210> 188

<211> 435

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB21 - Variável pesada

<400> 188

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg	120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc	180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtggtgg tataccgcag	240
agtctagact cgtggtggac ttctctccga ttcaccattt ccagagacaa tagcaagaac	300
accctgtatt tgcaattgaa cagtctgagg gctgaggaca cagccgtgta ttactgtgca	360
agacattatg gtcactacgt ggactatgct gtggactact ggggtcaagg aaccacggtc	420
accgtctcca gcgct	435

<210> 189

<211> 141

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB21 - Variável pesada

<400> 189

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ile Pro Gln Ser Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Trp Trp Thr Ser Leu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 85 90 95
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 190

<211> 390

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB21 - Variável leve

<400> 190

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctccatct cttgctttga aaggtttgag atattcccca aggaatggta cctgcagaaa	180
ccaggccagt ctccacagct cctgatctac aaagtttcca accgattttc tgggggtcca	240
gacagattca gtggcagtgg atcagggaca gatttcacac tcaagatcag cagagtggag	300
gctgaggata ccggagtgta ttactgcttt caaggttcac atgttccgtg gacgttcggt	360
ggaggcacca aggtggaaat caagcgtacg	390

<210> 191

<211> 125

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB21 - Variável leve

<400> 191

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Phe Glu Arg Phe Glu Ile
 35 40 45
 Phe Pro Lys Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu
 50 55 60
 Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
 85 90 95
 Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val
 100 105 110
 Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 192

<211> 423

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB26 - Variável pesada

<400> 192

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg	120
agaatgtcct gcaccattat ggaccagggtg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtgatagaac ctactatcca	240
gacactgtga agggccgatt caccatttcc agagacaata gcaagaacac cctgtatttg	300
caattgaaca gtctgagggc tgaggacaca gccgtgtatt actgtgcaag acattatggt	360
cactacgtgg actatgctgt ggactactgg ggtcaaggaa ccacggtcac cgtctccagc	420
gct	423

<210> 193

<211> 137

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB26 - Variável pesada

<400> 193

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Met Asp Gln Val Pro
 35 40 45
 Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 85 90 95
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 194

<211> 399

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB26 - Variável leve

<400> 194

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccttat cctatggtat      180

ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct      240
gggggtcccag acagattcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc      300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aaggttcaca tgttccgtgg      360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacg                               399

```

<210> 195

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<400> 195

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1          5          10          15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20          25          30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
          35          40          45

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50          55          60

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65          70          75          80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
          85          90          95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          100          105          110

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          115          120          125

```


<210> 196
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB26 - Variável pesada

<400> 196

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggg ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggccctg	120
agaatgtcct gcttcctacc agctacttta actatgggtt gggttcggca ggctccgggg	180
aaggggctgg agtggatcgc atacattggg agtgggtggg atagaacctt ctatccagac	240
actgtgaagg gccgattcac catttccaga gacaatagca agaaccctt gtatttgcaa	300
ttgaacagtc tgagggtga ggacacagcc gtgtattact gtgcaagaca ttatgggtcac	360
tacgtggact atgctgtgga ctactggggg caaggaacca cggtcaccgt ctccagcgct	420

<210> 197
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB26 - Variável pesada

<400> 197

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr
 35 40 45
 Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala
 50 55 60
 Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 65 70 75 80
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 85 90 95
 Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 100 105 110
 Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 198

<211> 399

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> sequência de DCIB26 - Variável leve

<400> 198

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccctat cctatggtat	180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240
gggggtcccag acagattcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc	300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aaggttcaca tgttccgtgg	360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacg	399

<210> 199

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB26 - Variável leve

<400> 199

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 200

<211> 423

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB37 - variável pesada

<400> 200

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggccctg	120
agaatgtcct gcaccattac tgaccagggtg cctttgtccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtgatagaac ctactatcca	240
gacactgtga agggccgatt caccatttcc agagacaata gcaagaacac cctgtatttg	300
caattgaaca gtctgagggc tgaggacaca gccgtgtatt actgtgcaag acattatggt	360
cactacgtgg actatgctgt ggactactgg ggtcaaggaa ccacggtcac cgtctccagc	420
gct	423

<210> 201

<211> 137

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB37 - variável pesada

<400> 201

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro
 35 40 45
 Leu Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 85 90 95
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 202

<211> 399

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB37 - variável leve

<400> 202

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120

```

gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccctat cctatggat      180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct      240
ggggtcccag acagattcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc      300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aagggtcaca tgttccgtgg      360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacg                               399

```

<210> 203

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB37 - variável leve

<400> 203

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1          5          10          15
Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20          25          30
Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
          35          40          45
Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          50          55          60
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          65          70          75          80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
          85          90          95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          100          105          110
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          115          120          125

```

<210> 204
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> Sequência de DCIB40 - variável pesada

<400> 204

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggccctg	120
agaatgtcct gcaccattac tgaccagggtg cctatctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtgatagaac ctactatcca	240
gacactgtga agggccgatt caccatttcc agagacaata gcaagaacac cctgtatttg	300
caattgaaca gtctgagggc tgaggacaca gccgtgtatt actgtgcaag acattatggt	360
cactacgtgg actatgctgt ggactactgg ggtcaaggaa ccacggtcac cgtctccagc	420
gct	423

<210> 205
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> Sequência de DCIB40 - variável pesada

<400> 205

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro
 35 40 45
 Ile Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 85 90 95
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 206

<211> 399

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB40 - variável leve

<400> 206

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60

cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccctat cctatggtat      180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct      240
ggggtcccag acagattcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc      300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aagggtcaca tgttccgtgg      360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacg                               399

```

<210> 207

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB40 - variável leve

<400> 207

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 208

<211> 423

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB41 - variável pesada

<400> 208

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc 60
 cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg 120

agaatgtcct gcaccattac tgaccaggtg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtggtg gtgatagaac ctactatcca	240
gacactgtga agggccgatt caccatttcc agagacaata gcaagaacac cctgtatttg	300
caattgaaca gtctgagggc tgaggacaca gccgtgtatt actgtgcaag acattatggg	360
cactacgtgg actatgctgt ggactactgg ggtcaaggaa ccacggtcac cgtctccagc	420
gct	423

<210> 209

<211> 399

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB41 - variável leve

<400> 209

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccttat cctatgggat	180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240
ggggtcccag acagattcag tggcagtggg tcaggagacag atttcacact caagatcagc	300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aagggttcaca tgttccgtgg	360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacg	399

<210> 210

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB41 - variável leve

<400> 210

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 211

<211> 423

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB42 - variável pesada

<400> 211

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg      120
agaatgtcct gcaccattac tgaccagggtg ccttactccg tgtgggttcg gcaggctccg      180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtgatagaac ctactatcca      240
gacactgtga agggccgatt caccatttcc agagacaata gcaagaacac cctgtatttg      300
caattgaaca gtctgagggc tgaggacaca gccgtgtatt actgtgcaag acattatggg      360
cactacgtgg actatgctgt ggactactgg ggtcaaggaa ccacggtcac cgtctccagc      420
gct                                                                    423

```

<210> 212

<211> 137

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB42 - variável pesada

<400> 212

```

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

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 85 90 95

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 213

<211> 399

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB42 - variável leve

<400> 213

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccctat cctatggtat	180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240
ggggtcccag acagattcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc	300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aaggttcaca tgttccgtgg	360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacg	399

<210> 214

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> sequência de DCIB42 - variável leve

<400> 214

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1          5          10          15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20          25          30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
          35          40          45

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50          55          60

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
65          70          75          80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
          85          90          95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          100          105          110

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          115          120          125

```

<210> 215

<211> 423

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB43 - variável pesada

<400> 215

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg	120
agaatgtcct gcaccattac tgaccagctg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtggtg gtgatagaac ctactatcca	240
gacactgtga agggccgatt caccatttcc agagacaata gcaagaacac cctgtatttg	300
caattgaaca gtctgagggc tgaggacaca gccgtgtatt actgtgcaag acattatggt	360
cactacgtgg actatgctgt ggactactgg ggtcaaggaa ccacggtcac cgtctccagc	420
gct	423

<210> 216

<211> 136

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> sequência de DCIB43 - variável pesada

<400> 216

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Thr Asp Gln Leu Pro
 35 40 45
 Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 85 90 95
 Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 100 105 110
 Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 217

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB43 - variável leve

<400> 217

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 218

<211> 137

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB41 - variável pesada

<400> 218

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro
 35 40 45
 Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 85 90 95
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 219

<211> 399

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB43 - variável leve

<400> 219

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctcgatct cttgcaactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccctat cctatggtat	180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240
ggggtcccag acagattcag tggcagtggg tcagggacag atttcacact caagatcagc	300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aaggttcaca tgttccgtgg	360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacg	399

<210> 220

<211> 417

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB35 - variável pesada

<400> 220

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtcctg	120
agaatgtcct gcaccattat ggaccagggtg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtagtgttta tgattttttt	240
gtgtggctcc gattcaccat ttccagagac aatagcaaga acaccctgta tttgcaattg	300
aacagtctga gggctgagga cacagccgtg tattactgtg cgagacatta tggtcactac	360
gtggactatg ctgtggacta ctgggggtcaa ggtaccacgg tcaccgtctc cagcgct	417

<210> 221

<211> 135

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB35 - variável pesada

<400> 221

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1          5          10          15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
          20          25          30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Met Asp Gln Val Pro
          35          40          45

Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50          55          60

Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
65          70          75          80

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
          85          90          95

Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
          100          105          110

His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          115          120          125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          130          135

```

<210> 222

<211> 408

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB35 - variável leve

<400> 222

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctcgatct ctgctggaa caggcagctg tatccagagt ggacagaagc ccagagactt	180
gactggtatc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac	240
cgattttctg gggccccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga ttccacactc	300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgctttca aggttcacat	360
gttccgtgga cgttcgggtg aggcaccaag gtggaaatca agcgtacg	408

<210> 223

<211> 131

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB35 - variável leve

<400> 223

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Asn Arg Gln Leu Tyr
 35 40 45
 Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

<210> 224

<211> 417

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB50 - variável pesada

<400> 224

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtccttg	120
agaatgtcct gcaccattat ggaccaggtg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtagtgttta tgattttttt	240
gtgtggctcc gattcaccat ttccagagac aatagcaaga acaccctgta tttgcaattg	300
aacagtctga gggctgagga cacagccgtg tattactgtg cgagacatta tggtcactac	360
gtggactatg ctgtggacta ctgggggtcaa ggtaccacgg tcaccgtctc cagcgct	417

<210> 225

<211> 135

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB50 - variável pesada

<400> 225

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Met Asp Gln Val Pro
 35 40 45
 Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 85 90 95
 Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105 110
 His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 226

<211> 431

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB50 - variável leve

<400> 226

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta	180
gaatgggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac	240
cgattttctg ggggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga ttccacactc	300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgctggaa caggcagctg	360
tatccagagt ggacagaagc ccagagactt gacttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc	420
aagcgtacgm g	431

<210> 227

<211> 138

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB50 - variável leve

<400> 227

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp
 115 120 125
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 130 135

<210> 228

<211> 420

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB71 - Variável pesada

<400> 228

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggtcctg	120
agaatgtcct gcatcttgat caattcccta cctcttgat gggttcggca ggctccggg	180
aaggggctgg agtggatcgc atacattggt agtgggtggtg atagaaccta ctatccagac	240
actgtgaagg gccgattcac cattccaga gacaatagca agaaccacct gtatttgcaa	300
ttgaacagtc tgagggctga ggacacagcc gtgtattact gtgcaagaca ttatggtcac	360
tacgtggact atgctgtgga ctactggggt caaggaacca cggtcacctg ctccagcgct	420

<210> 229

<211> 136

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB71 - Variável pesada

<400> 229

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro
 35 40 45
 Leu Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala
 50 55 60
 Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 65 70 75 80
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 85 90 95
 Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 100 105 110
 Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 230

<211> 399

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB71 - Variável leve

<400> 230

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccctat cctatggtat	180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240
gggggtccag acagattcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc	300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aagggtcaca tgttccgtgg	360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacg	399

<210> 231

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB71 - Variável leve

<400> 231

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 232

<211> 426

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB72 - variável pesada

<400> 232

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggccctg	120
agaatgtcct gtgcagcctc tggattcgct ttcaatacct atgacatgtc ttgggttcgc	180
caggctccgg ggaaggggct ggagtggatc gcatacattg gtagtggtgg tatcttgatc	240
aattccctac ctcttgtagc attcaccatt tccagagaca atagcaagaa caccctgtat	300
ttgcaattga acagtctgag ggctgaggac acagccgtgt attactgtgc aagacattat	360
ggtcactacg tggactatgc tgtggactac tggggtcaag gaaccacggt caccgtctcc	420
agcgct	426

<210> 233

<211> 138

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB72 - variável pesada

<400> 233

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45
 Asn Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ile Leu Ile Asn Ser Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 85 90 95
 Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Ala Arg His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 234

<211> 399

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB72 - variável leve

<400> 234

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccctat cctatggtat	180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240
ggggtcccag acagattcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc	300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aaggttcaca tgttccgtgg	360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacg	399

<210> 235

<211> 128

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB72 - variável leve

<400> 235

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 236

<211> 1413

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIBS3 - variável pesada

<400> 236

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg aggggtccctg    120
agaatgtcct gcaccattat ggaccagggtg cctttctccg tgtgggttcg gcaggctccg    180
gggaaggggc tggagtggat cgcatacatt ggtagtgggtg gtagtgttta tgattttttt    240
gtgtggctcc gattcaccat ttccagagac aatagcaaga acaccctgta tttgcaattg    300
aacagtctga gggctgagga cacagccgtg tattactgtg cgagacatta tggtcactac    360
gtggactatg ctgtggacta ctgggggtcaa ggtaccacgg tcaccgtctc cagcgctaaa    420
acaacagccc catcgggtcta tccactggcc cctgtgtgtg gagatacaac tggctcctcg    480
gtgactctag gatgcctggt caaggggttat ttccctgagc cagtgcctt gacctggaac    540
tctgggtccc tgtccagtgg tgtgcacacc ttcccagctg tcctgcagtc tgacctctac    600
accctcagca gctcagtgac tgtaacttcg agcacctggc ccagccagtc catcacctgc    660
aatgtggccc acccggcaag cagcaccaag gtggacaaga aaattgagcc cagagggccc    720
acaatcaagc cctgtcctcc atgcaaatgc ccagcaccta acctcttggg tggaccatcc    780
gtcttcatct tccctccaaa gatcaaggat gtactcatga tctccctgag ccccatagtc    840
acatgtgtgg tgggtgatgt gagcgaggat gaccagatg tccagatcag ctgggtttgtg    900
aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca caaacccata gagaggatta caacagtact    960
ctccgggtgg tcagtgcctt ccccatccag caccaggact ggatgagtg caaggagttc   1020
aaatgcaagg tcaacaacaa agacctcca gcgcccacg agagaaccat ctcaaaaccc   1080
aaagggtcag taagagctcc acaggtatat gtcttgctc caccagaaga agagatgact   1140
aagaaacagg tcaacttgac ctgcatggtc acagacttca tgctgaaga catttacgtg   1200
gagtggacca acaacgggaa aacagagcta aactacaaga aactgaacc agtcctggac   1260
tctgatggtt cttacttcat gtacagcaag ctgagagtgg aaaagaagaa ctgggtggaa   1320
agaaatagct actcctgttc agtgggtccac gagggctgc acaatcacca cagactaag   1380
agcttctccc ggactccggg taaatgatct aga                                1413

```

<210> 237

<211> 465

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB53 - variável pesada

264

<400> 237

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Thr Ile Met Asp Gln Val Pro
 35 40 45
 Phe Ser Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 50 55 60
 Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 85 90 95
 Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100 105 110
 His Tyr Gly His Tyr Val Asp Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
 195 200 205
 Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 210 215 220
 Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
 225 230 235 240
 Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
 275 280 285
 Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
 290 295 300
 Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
 325 330 335
 Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
 355 360 365
 Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
 370 375 380
 Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
 385 390 395 400
 Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
 420 425 430
 Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
 435 440 445
 Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
 450 455 460
 Lys
 465

<210> 238

<211> 729

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB53 - variável leve

<400> 238

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc 60

cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca 120
gcctcgatct cttgcactcc tccagcttat agaccaccaa atgcccctat cctatggtat 180
ctgcagaaac caggccagtc tccacagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
gggggtcccag acagattcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatac cggagtgtat tactgctttc aagggttcaca tgttccgtgg 360
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aagcgtgcag atgctgcacc aactgtatcg 420
atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
actcacaaga catctacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttagctc 720
gagtctaga 729

<210> 239

<211> 235

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB53 - variável leve

<400> 239

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 35 40 45
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 85 90 95
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 130 135 140
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 165 170 175
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 195 200 205
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 210 215 220
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 240

<211> 1449

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB64 - Variável pesada

<400> 240

```

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
actcccaggt gcagctgggt gagactgggc ggaggcttaa tccagcctgg aggggtccctg     120
agaatgtcct gcgggacagg cagggcaatg ctgggcacac acaccatgga agtgactgtc      180
taccattggg ttcggcaggc tccggggaag gggctggagt ggatcgcata cattggtagt      240
ggtggttagtg tttatgattt ttttgtgtgg ctccgattca ccatttcag agacaatagc      300
aagaacaccc tgtatttgca attgaacagt ctgagggctg aggacacagc cgtgtattac      360
tgtgcccgat ggaacaggca gctgtatcca gagtggacag aagcccagag acttgactgg      420
ggccaaggaa ccacggtcac cgtctccagc gctaaaacaa cagccccatc ggtctatcca      480
ctggccccctg tgtgtggaga tacaactggc tcctcgggtga ctctaggatg cctgggtcaag      540
ggttatttcc ctgagccagt gaccttgacc tggaaactctg gttccctgtc cagtgggtgtg      600
cacaccttcc cagctgtcct gcagtctgac ctctacaccc tcagcagctc agtgactgta      660
acttcgagca cctggcccag ccagtcctac acctgcaatg tggcccaccc ggcaagcagc      720
accaaggtgg acaagaaaat tgagcccaga gggcccacaa tcaagccctg tcctccatgc      780
aaatgcccag cacctaacct cttgggtgga ccatcctctt tcattctccc tccaaagatc      840
aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc atagtcacat gtgtgggtgg ggatgtgagc      900
gaggatgacc cagatgtcca gatcagctgg tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct      960

```

```

cagacacaaa cccatagaga ggattacaac agtactctcc gggtggtcag tgccctcccc      1020
atccagcacc aggactggat gagtggcaag gagttcaaat gcaagggtcaa caacaaagac      1080
ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca aaacccaaag ggtcagtaag agctccacag      1140
gtatatgtct tgccctccacc agaagaagag atgactaaga aacagggtcac tctgacctgc      1200
atgggtcacag acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt ggaccaacaa cgggaaaaca      1260
gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg atgggttctta cttcatgtac      1320
agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg      1380
gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg actaagagct tctcccgac tccgggtaaa      1440
tgatctaga                                     1449

```

<210> 241

<211> 476

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB64 - Variável pesada

<400> 241

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Met Ser Cys Gly Thr Gly Arg Ala Met Leu
 35 40 45

Gly Thr His Thr Met Glu Val Thr Val Tyr His Trp Val Arg Gln Ala
 50 55 60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Gly Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 85 90 95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu
 115 120 125

Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175
 Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
 195 200 205
 Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser
 210 215 220
 Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
 225 230 235
 Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro
 245 250 255
 Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe
 260 265 270
 Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val
 275 280 285
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile
 290 295 300
 Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr
 305 310 315
 His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
 340 345 350
 Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro
 355 360 365
 Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu
 370 375 380
 Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp
 385 390 395 400
 Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr
 405 410 415
 Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 420 425 430

Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu
 435 440 445

Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His
 450 455 460

His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 242

<211> 738

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB64 - variável leve

<400> 242

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca	120
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc ctggtacata gtaatggaaa cacctattta	180
gaatgggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac	240
cgattttctg gggcccaga cagattcagt ggcagtggat caggacaga ttccacactc	300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgctttca aggttcacat	360
gttccgtgga cgttcggtag aggcaccaag gtggaaatca agcgtgcaga tgctgcacca	420
actgtatcga tcttcccacc atccagttag cagttaacat ctggagggtgc ctgagtcgtg	480
tgcttcttga acaacttcta ccccaaagac atcaatgtca agtgggaagat tgatggcagt	540
gaacgacaaa atggcgtcct gaacagttgg actgatcagg acagcaaaga cagcacctac	600
agcatgagca gcaccctcac gttgaccaag gacgagtatg aacgacataa cagctatacc	660
tgtgaggcca ctcacaagac atctacttca ccattgtgca agagcttcaa caggaatgag	720
tgtagctcg agtctaga	738

<210> 243

<211> 238

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB64 - variável leve

<400> 243

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 244

<211> 453

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB68 - variável pesada

<400> 244

aagcttacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc	60
cactcccagg tgcagctggt ggagactggg ggaggcttaa tccagcctgg agggcccctg	120
agaatgtcct gcgggacagg cagggcaatg ctgggcacac acaccatgga agtaactgtc	180
taccattggg ttcggcaggc tccggggaag gggctggagt ggatcgcata cattggtagt	240
ggtggtagtg tttatgattt ttttgtgtgg ctccgattca ccatttccag agacaatagc	300
aagaacaccc tgtatttgca attgaacagt ctgagggctg aggacacagc cgtgtattac	360
tgtgcccgat ggaacaggca gctgtatcca gagtggacag aagcccagag acttgactgg	420
ggccaaggta ccacggtcac cgtctccagc gct	453

<210> 245

<211> 147

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB68 - variável pesada

<400> 245

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

<210> 246

<211> 435

<212> ADN

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB68 - variável leve

<400> 246

```

ggatccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc taccggagtc      60
cactccgatg tgttgatgac ccaatctcca ctctccctgc ctgtcactcc tggggagcca      120
gcctcgatct cttgctggaa caggcagctg tatccagagt ggacagaagc ccagagactt      180
gactggtatc tgcagaaacc aggccagtct ccacagctcc tgatctacaa agtttccaac      240
cgattttctg ggggtcccaga cagattcagt ggcagtggat cagggacaga tttcacactc      300
aagatcagca gagtggaggc tgaggatacc ggagtgtatt actgcgggac aggcagggca      360
atgctgggca cacacaccat ggaagtgact gtctaccatt tcggtggagg caccaagggtg      420
gaaatcaagc gtacg                                     435

```

<210> 247

<211> 140

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Sequência de DCIB68 - variável leve

<400> 247

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Asn Arg Gln Leu Tyr
 35 40 45
 Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gly Thr Gly Arg Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val Thr Val
 115 120 125
 Tyr His Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 130 135 140

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 9619584 A, Bona [0003] [0018] [0026]
- US 7067110 B [0004] [0018]
- EP 0759944 A [0005] [0018]
- WO 0064488 A [0006] [0019]
- WO 02092126 A [0007]
- US 5225539 A, Winter [0014] [0022]
- US 4816397 A [0014] [0022]
- US 4816567 A [0014] [0022]
- WO 0188138 A [0054]
- EP 2008053761 W [0152]
- GB 0706070 A [0152]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **Alexander-Miller.** *Immunologic Research*, 2005, vol. 31, 13-24 [0002]
- **Hodge et al.** *J Immunol*, 2005, vol. 174, 5994-6004 [0002] [0098]
- **Valmori et al.** *J Immunol*, 2002, vol. 168, 4231-40 [0002] [0098]
- **Zeh et al.** *J Immunol*, 1999, vol. 162, 989-94 [0002] [0020] [0098]
- **Khong ; Rosenberg.** *J Immunol*, 2002, vol. 168, 951-6 [0002]

- **Vignard et al.** *J Immunol*, 2005, vol. 175, 4797-805 [0002]
- **Dudley et al.** *J Immunother*, 2001, vol. 24, 363-73 [0002]
- **Morgan et al.** *J Immunol*, 2003, vol. 171, 3287-95 [0002]
- **Rosenberg ; Dudley.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, vol. 101 (2), 14639-45 [0002]
- **Sakaguchi et al.** *J.Immunol*, 1995, vol. 155, 1151-1164 [0010]
- **Sakaguchi et al.** *J Immunol*, 1995, vol. 155, 1151-1184 [0010]
- **Shevach.** *Immunity*, 2006, vol. 25, 195-201 [0010] [0011]
- **Coleman et al.** *J. Cell Mot. Med*, 2007, vol. 11, 1291-1325 [0010]
- **Shimizu et al.** *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, 5211-5218 [0010]
- **Onizuka et al.** *Cancer Research*, 1999, vol. 59, 3128-3133 [0010]
- **Tanaka et al.** *J. Immunother.*, 2002, vol. 25, 207-217 [0010]
- **Tanalcaetal.** *J.Immunother.*,2002,vol.25, 207-217 [0010]
- **Dannull et al.** *J. Clin. Invest.*, 2005, vol. 115, 3623-3633 [0010]
- **Sutmuller et al.** *J. Exp. Mad.*, 2001, vol. 194, 823-832 [0010]
- **Woo et al.** *Cancer Research*, 2001, vol. 61, 4766-4772 [0010]
- **Curieleetal.** *Nature Medicine*, 2004, vol. 10, 942-949 [0010]
- **Wolf et al.** *Clin. Cancer Research*, 2003, vol. 9, 606-612 [0010]
- **Sasada et al.** *Cancer*, 2003, vol. 98, 1089-1099 [0010]
- **Sasacia et al.** *Cancer*, 2003, vol. 98, 1089-1099 [0010]

- **Liyanage et al.** *J. Immunology*, 2002, vol. 169, 2756-2761 [0010]
- **Matsuura et al.** *Cancer*, 2006, vol. 106, 1227-1236 [0010]
- **Yang et al.** *Blood*, 2006, vol. 107, 3639-3646 [0010]
- **Alvaro et al.** *Clin. Cancer Research*, 2005, vol. 11, 1467-1473 [0010]
- **Ichihara et al.** *Clinical Cancer Research*, 2003, vol. 9, 4404-4408 [0010]
- **Curieletal.** *Nature Meáicine*, 2004, vol. 10, 942-949 [0010]
- **Piccirillo et al.** *J. Immunology*, 2001, vol. 167, 1137-1140 [0010]
- **Mempel et al.** *Immunity*, 2006, vol. 25, 129-141 [0010]
- **Annacker et al.** *J. Immunology*, 2001, vol. 166, 3008-3018 [0010]
- **Wooetal.** *J. Immunology*, 2002, vol. 168, 4272-4276 [0010]
- **Liyanage et al.** *J. Immunology*, 2002, vol. 169, 2756-2761 [0010]
- **Nishikawa et al.** *Blood*, 2005, vol. 106, 008-1011 [0010]
- **Romagnani et al.** *Eur. J. Immunol.*, 2005, vol. 35, 2452-2458 [0010]
- **Ralainirina et al.** *J. Loukoc Biol.*, 2007, vol. 81, 144-153 [0010]
- **Limetal.** *J. Immunology*, 2005, vol. 175, 4180-4183 [0010]
- **Shevach.** *Immunity*, 2006, vol. 25, 196-201 [0011]
- **Bluestone et al.** *Nat. Immunol.*, 2005, vol. 6, 345-352 [0011]
- **Sakaguchi et al.** *Nat. Immunology*, 2005, vol. 6, 345-352 [0011]
- **Picca et al.** *Current Opinion in Immunafogy*, 2005, vol. 17, 131-136 [0011]
- **Jordan et al.** *Nature Immunology*, 2001, vol. 2 (4), 301-306 [0011]

- **Picca et al.** *Immunological Reviews*, 2006, vol. 212, 74-85 [0011]
- **Akbar et al.** *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, vol. 7, 231-237 [0011]
- **von Boehmer.** *Nature Immunology*, 2005, vol. 6 (4), 338-344 [0011]
- **Whang et al.** *Immunity*, 2004, vol. 20, 107-118 [0012]
- **Venceetal.** *PNAS*, 2007, vol. 104(52), 20884-20889 [0012]
- **Chakraborty et al.** *Hum. Immunology*, 2004, vol. 65, 794-802 [0012]
- **Thorton ; Shevach.** *J. Immunology*, 2000, vol. 164, 183190 [0012]
- **Lietal.** *Immunol. Cell Biol.*, 2007, vol. 85(3), 197-204 [0012]
- **Harada et al.** *Immunology*, 2001, vol. 104, 67-74 [0020]
- **Sambrook ; Fritsch ; Maniatis.** *Molecular Cloning''*, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0032]
- **Ausubel et al.** *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, 1992 [0032]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0039]
- **Sanger et al.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, vol. 74, 5463-7 [0054]
- **Bloom et al.** *The Journal of Experimental Medicine*, 1997, vol. 185, 453-9 [0089]
- **Rosenberget al.** *J Immunol*, 2005, vol. 175, 6169-76 [0098]
- **Rosenberg et al.** *Nature Medicine*, 2004, vol. 10, 909-15 [0098]
- **Alexander-Miller.** *Immunologic research*, 2005, vol. 31, 13-24 [0098]
- **Alexander-Miller et al.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, vol. 93, 4102-7 [0098]

- **Oh et al.** *J Immunol*, 2003, vol. 170, 2523-30 **[0098]**
- **Ramage et al.** *Int. J. Cancer*, 2004, vol. 110, 245-250 **[0129]**
- **Chapiro et al.** *J Immunol*, 2006, vol. 176, 1053-61 **[0136]**
- **Macagno et al.** *Eur J Immunol*, 2001, vol. 31, 3271-80 **[0136]**
- **Overwijk et al.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, vol. 96, 2982-7 **[0144]**
- **Lance et al.** *Cancer Research*, 2004, vol. 64, 1509-14 **[0144]**
- **Steitz et al.** *Cancer Immunol Immunother*, 2006, vol. 55, 246-53 **[0144]**
- **Rosenberg ; White.** *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 1996, vol. 19, 81-4 **[0144]**

REIVINDICAÇÕES

1. Um ácido nucleico que compreende um promotor não específico e uma sequência que codifica um anticorpo recombinante, em que a molécula de anticorpo tem epítomos de linfócitos T heterólogos na mesma de modo que o anticorpo não pode tomar a sua conformação nativa quando o ácido nucleico é expresso, sendo os epítomos de linfócitos T heterólogos:

GTGRAMLGHTMEVTVYH em CDRH1 e CDRL3

SVYDFFVWL em CDRH2, e

WNRQLYPEWTEAQRLD em CDRH3 e CDRL1.

2. Um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que os epítomos de linfócitos T são inseridos no anticorpo.

3. Um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que os epítomos de linfócitos T são substituídos no anticorpo.

4. Um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

5. Um ácido nucleico de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o anticorpo é humanizado ou quimerizado.

6. Um ácido nucleico de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que a sequência que codifica a cadeia pesada do anticorpo recombinante compreende adicionalmente uma sequência líder.

7. Um ácido nucleico de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o anticorpo tem a sequência da Figura 60.

8. Uma vacina que compreende um ácido nucleico de acordo com qualquer reivindicação anterior e um adjuvante.

9. Uma composição farmacêutica que compreende um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.

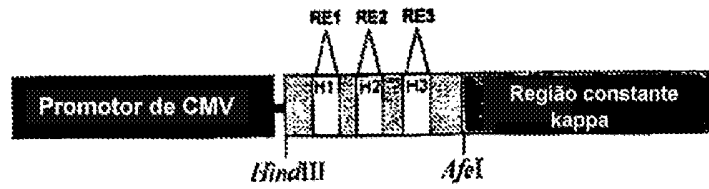
10. Um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 para utilização em medicina.

11. Um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 10 para utilização na estimulação de uma resposta imune contra pelo menos um dos epítomos de linfócitos T.

12. A utilização de um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 no fabrico de um medicamento para estimular uma resposta imune contra pelo menos um dos epítomos de linfócitos T.

Figura 1

a



b

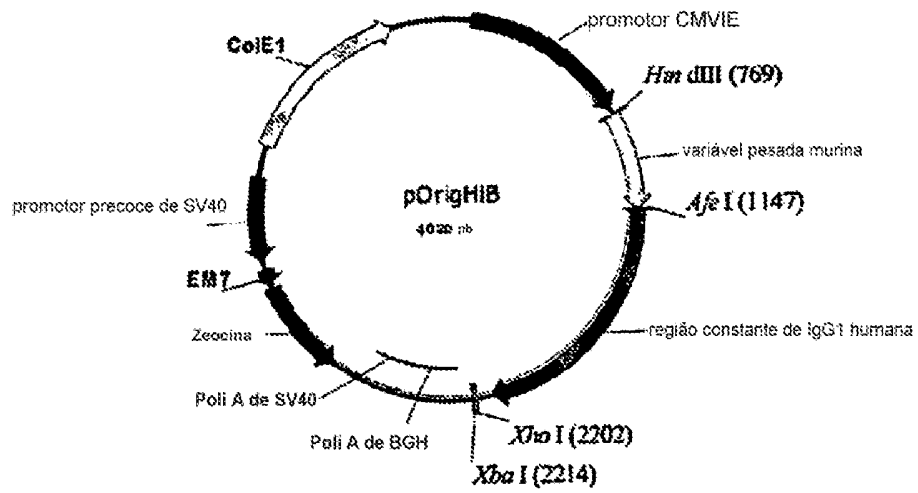
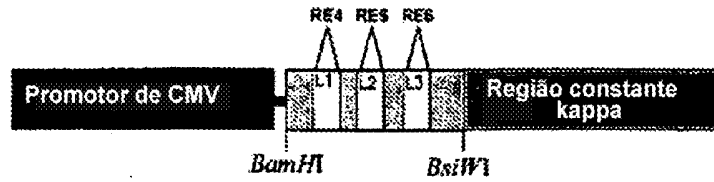


Figura 2

a



b

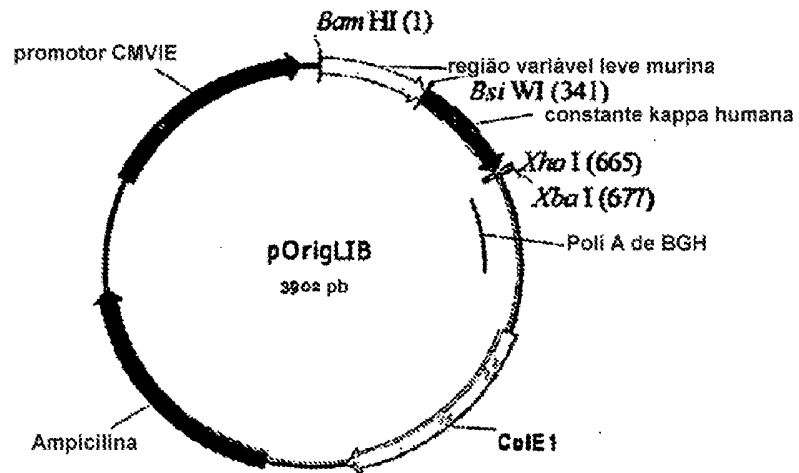


Figura 5

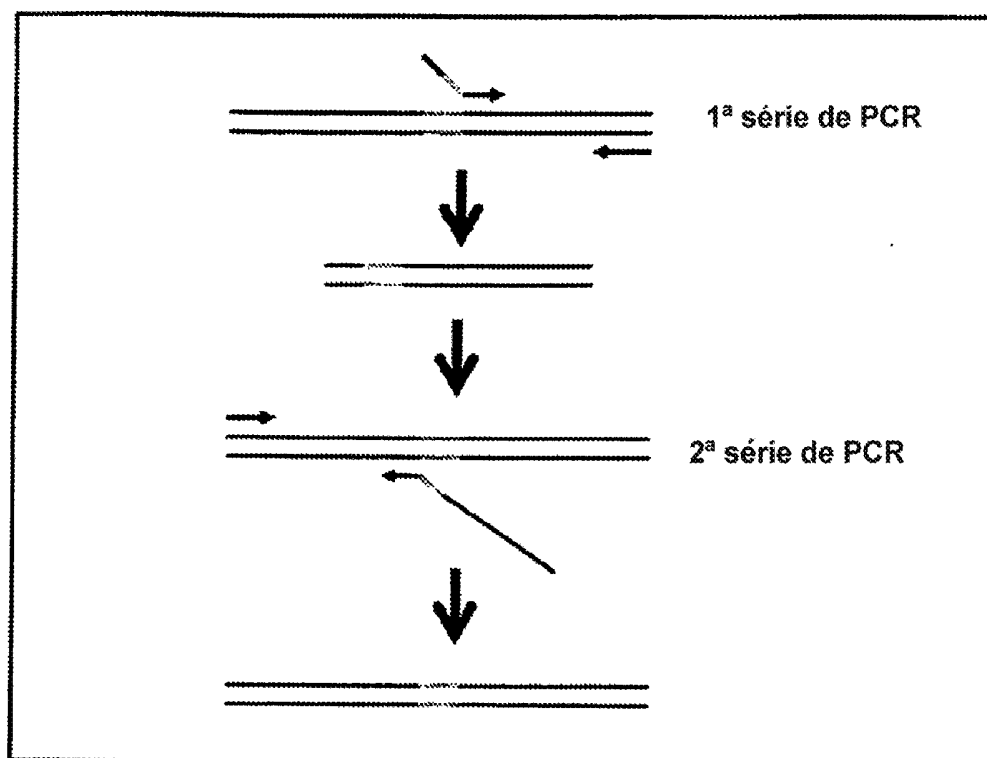


Figura 6

H1

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
 ATGGGAATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT
 G G G L I Q P G G S L R M S C Q A P G K G L E W I A
 GGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTTCCGAGGCTCCGGGAGGGGCTGGAGTGGATCGCA
 Y I G N G G D R T Y Y P D T V K G R F Y I S R D N S
 TACATGGTAGTGGTGGTGTATAGAACCTACTATCCAGACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGAGACATAGC
 K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R N Y G
 AAGAACAACCTGTATTTGCAATTGAACAGCTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACCTGCAAGACATTATGCT
 H Y V D Y A V D Y W G Q G T I V T V S S A
 CACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGTCAAGGTACACGGTCACCGTCTCCAGCGCT

FspI

H2

N G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
 ATGGGAATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT
 G G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D
 GGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTTGTGCAGCCTCTGGATTCCCTTTCATATACCTATGAC
 M S W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G I S R D
 ATGTCTTGGGTTCCGCCAGGCTCCGGGAGGGGCTGGAGTGGATCCATACATTGGTAGTGGTGGCCATTTCAGAGAC
 N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R H
 AATGCAAGACACCCCTGTATTGCAATTGAACAGCTCTGAGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAGACAT
 Y G H Y V D Y A V D Y W G Q G T I V T V S S A
 IATGGTCACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACIAGGGTCAAGGTACACGGTCACCGTCTCCAGCGCT

NcoI

H3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
 ATGGGAATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT
 G G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A F N T Y D
 GGGGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAATGTCTTGTGCAGCCTCTGGATTCCCTTTCATATACCTATGAC
 M S W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G G D R T Y
 ATGTCTTGGGTTCCGCCAGGCTCCGGGAGGGGCTGGAGTGGATCCATACATTGGTAGTGGTGGTGGATAGAACCTAC
 Y P D T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q L N S
 IATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGAGACAATAGCAGAGAACCCCTGTATTGCAATTGAGCAGT

SrfI

L R A E D T A V Y Y C A G G G T I V T V S S A
 CTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGGCCGGGCAAGGTACACGGTCACCGTCTCCAGCGCT

Figura 6 continuação

H1/H2

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

FspI

G G G L I Q P G G S L R M S C Q A P G K G L E W I A
GGGGAGGCTTAATCCAGCTGTGAGGGTCCCTGAGAATGTCTCCGCGAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCCCA

MscI

Y I G S G I S R D N S K N T L Y L Q L N S L R A E
TACATTGGTAGTGGTGGCCATTTCCAGAGACAATAGCAAGAACCCCTGTATTTGCATTTGACAGTCTGAGGGCTGAG

D T A V Y Y C A R H Y G W Y V D Y A V D Y W G Q G T
GACACAGCCCTGTATTACTGTGCAGACATTATGGTCACACGCTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACC

I V I V S S A
ACGGTACCCGTCTCCAGCGCT

H1/H3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

FspI

G G G L I Q P G G S L R M S C Q A P G K G L E W I A
GGGGAGGCTTAATCCAGCTGTGAGGGTCCCTGAGAATGTCTCCGCGAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCCCA

Y I G S G G D R T Y Y P D T V K G R F T I S K D N S
TACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACCTGTGGAAGGCGGATTACCATTTCCAGAGACAATAGC

SrfI

K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A G Q G
AAGAACCCCTGTATTGTCAATTGAAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCCGGCCAGGT

I T V I V S S A
ACCAGGCTACCCGTCTCCAGCGCT

H2/H3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

G G G L Y Q F G G E L R M S C A A S G F A F N Y Y D
GGGGAGGCTTAATCCAGCTGTGAGGGTCCCTGAGAATGTCTGTGCAGCCCTCTGGATTGCTTTCAATACCATGAC

MscI

M S W V R Q A P G K G L E W I A Y I G S G I S R D
ATGTCTTGGGTTCCGAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCCCATACATTTGGTAGTGGTGGCCATTTCCAGAGAC

SrfI

N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A G
AAIAGCAAGAACACCCCTGTATTGTCAATTGAAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCCGGC

O G T I V I V S S A
CAAGGTACCCGTCTCCAGCGCT

Figura 6 continuação

H1/H2/H3

M G R S C I L L F L V A I A I G V H S Q V Q L V E I
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACT

FspI

S G G L I Q P G G S I R M S C Q A E G K G L E W I A
 GGGGAGGCTTAAATCCAGCTCTGGAGGGTCCCTGAGAAATGTCCTGCGCAGGCTCCCGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCA

MscI

Y I G S G I S R D N S R N I L Y L Q L N S L R A E
 TACATTGCTAGTGGTGGCCATTTCAGAGACAAIAGCAAGAACACCCCTGTATTTCGAATTGAACAGTCTGAGGGCTGAG

SrfI

D T A V Y Y C A G Q G T I V I V S S A
 GACACAGCCGTGTATCTGTGCCCCGGCCAGGTACACGGTCAACCGTCTCCAGCGCT

Figura 7

L1

M G W S C I I L F L V A T A I G V H S D V L M T Q S P L
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCCACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGIGTGTGATGCCCAATCTCCACIC

ScaRV

S L P V T P G E F A S L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S
 TCCCTGCTGTCACTCTCTGGGAGCCAGCCCTCGATATCTCCAGAAACCGGCGAGTCTCCACAGCTCTCTGATCTACAAAGTTCC
 N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L E I S R V E A
 AACCGATTTTCTGGGCTCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGCT
 E D I G V Y Y C F Q G S H V P N T F G G G I K V E I N
 GAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTTCATGTTCCCTGGACGTTCCGTTGGAGGCCACCAAGGTTGAAATCAAGCGTACG

L2

M G W S C I I L F L V A T A I G V H S D V L M T Q S P L
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCCACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGIGTGTGATGCCCAATCTCCACIC

S L P V T P G E F A S I S C R S S Q S L V H S N G N I Y
 TCCCTGCTGTCACTCTCTGGGAGCCAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTAT

SspI

L E W Y L Q K P G Q S P Q L L F S G S G S G T D F T L
 TTAGAATGGIACCTGCGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCTCTAATATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACIC
 K I S R V E A E D I G V Y Y C F Q G S H V P N T F G G G
 ARGATCAGCAGAGTGGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTTCATGTTCCCTGGACGTTCCGTTGGAGGC
 T K V E I K
 ACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG

L3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCCACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGIGTGTGATGCCCAATCTCCACIC

S L P V T P G E F A S I S C R S S Q S L V H S N G N I Y
 TCCCTGCTGTCACTCTCTGGGAGCCAGGCCCTCCACTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCCTGGTACATAGTAATGGAACACCTAT

L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D
 TTAGAATGGIACCTGCGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGTCTCTGATCTACAGATTTCACACCGATTTTCTGGGCTCCAGAC

HpaI

R F S G S G S C T D F T L E I S R V E A E D T G V T R V
 AGATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCAGGATACCGGAGTTAACCAGGTTG
 E I K
 GAAATCAAGCGTACG

Figura 7 continuação

L1/L2

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAAATCTCCACTC

 S L P V T P G E P A S L Q K P G Q S P Q L L F S G S
 TCCCTGCTGTCACTCCCGGGAGCCAGCCTCGATATCTGCAGAAACAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATATTCTGGTGGCAGT

 G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V Y Y C P Q G S H
 GGAICAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTCAGGATACCGGAGTGTATTAAGCTTCAAGCTTCACAT

 V P W T F G G G I K V E I K
 GTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG

L1/L3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAAATCTCCACTC

 S L P V T P G E P A S L Q K P G Q S P Q L L I V K V S
 TCCCTGCTGTCACTCCCGGGAGCCAGCCTCGATATCTGCAGAAACAGGCCAATCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCC

 N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A
 AACCGATTTCCTGGGGTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGATCAGGACAGATTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT

 E D T G V T K V E I K
 GAGGATACCGAGTTAAACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG

L2/L3

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P L
 ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGACCCAAATCTCCACTC

 S L P V T P G E P A G I S C R S S Q S L V H S N G M T Y
 TCCCTGCTGTCACTCCCGGGAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGACCCCTGCTACATATATGGAAACAGCTAT

 L E N Y L Q K P G Q S P Q L L F S G S G S G T D F T L
 TTAGAAAGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATATTCTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTC

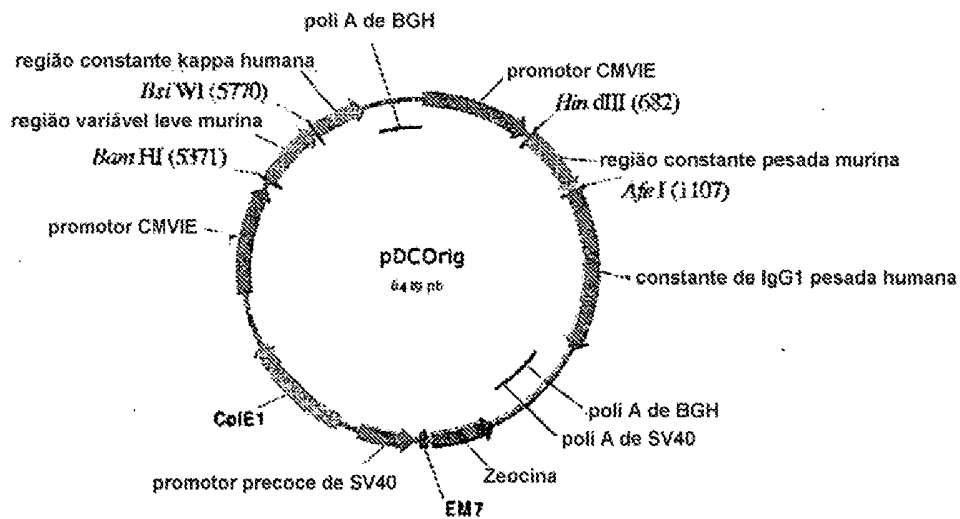
 K I S R V E A E D T G V T K V E I K
 AAGAICAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTTAAACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACG

Figura 7 continuação

L1/L2/L3

M G W S C I I L F L V A I A T G V H S D V L M T Q S P L
 ATGGGATGGAGGTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACUGGAGTCCACTCCGATGTGTGTGATGACCCATCTCCACTC
 S L P V T P G E P A S L Q K P G Q S P Q L L F S G S
 TCCCTGCCCTCTCTCTGGGAGCCAGCCCTCGATATCTGCAGAAACAGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATATTTCAGTGGCAGT
 G S G T D F T L K I S R V E A E D T G V T E V E I K
 GGATCAGGACACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTTAAACCAAGGTGGAGATCAAGTGTACG

Figura 8



[illegible]

Cadeia pesada

[illegible]

Figura 11

Cadeia leve

BamHI M G V L M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C T P P
 1 GGATCCACGATGGATGCTTGAAGACCAATCTCCACTCTGCGCGCTGGGGAGCCAGGCTGCATCTCTGGACTCTCCA 90

A Y R P P N A P I L W Y L Q R P G Q S P Q L L I Y R V S D R
 91 KTTATAGACCACTAAATSCCCTATCTCTATGGTATCTGCGAGAACCCAGGCCACTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAATTTCCACCGA 180

F S S V P D R F S G S G S G T D P T L K I G R V E A E D T S
 181 TTTCTGAGGTCACAGACGATTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACACTCAAGTTCAGCGAGTGGAGGCTGAGGATACCGA 270

V Y Y C F Q G S H V F N T F G G G T R V E I K **HsiNI**
 272 GTGATTACTGCTTCAAGCTTCACATGTTCCGTCGAGCTTCGGTGGAGGACCAAGGTTGGAATCAAGGGTACG 345

Figura 13

AfaI
 G A S T K G P S V F P F L A F C S R N T S G G T A A L S C L V
 A G C G C T T C C A C C A A G G G C C A T C G G T T T C C C C T G G C C C C T G C T C A S S A G G C A C T C T G G G G G C A C A G G G C C C T G G G T G C C T G G T C
 1 ----- 90
 K D V S F P E F V T V S W N S G A L T S S V H T F P A V I Q S
 A A G G A C T A C T T C C C G A A C C S T G A C G G T G T C G T G G A A C T C A G G G G K T T E R C A S S G S C T G C A C A C C T T C C D G G C T G C C T A C A C T C C
 91 ----- 180
 S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q I V T C N V N H K P
 T C A G G A C T C T A C T C C C T C A G C A G C T G S T E A C C T S C C C T C C A G C A C T T S G G C A C C C A G A C C T A C A C C T G C A A C G T G A A T C A C A A G C C C
 181 ----- 270
 S N T R V D K R V E L K T F L G D I T H I C P R C P E P K S
 A G C A A C C C A A G G T G G A C A A G A G T T G A K T T C A A A A C C C A C T T G G T G A T A C A A C T C A C A C T G C C A G S T S G C C A G A G C C A A T T
 271 ----- 360
 C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S
 T G T G A C A C A C C T C C C C G T G C C C A C G S T G C C A G A G C C C A A T T C T G T G A C A C A C T C C C C C C T G C C A C G S T G C C C A G A G C C A A T T
 361 ----- 450
 C D T P P P C P R C P A P E L L G G P S V F L E P P E P K D
 I G T G A C A C C C T C C C C A T G C C C A C S T G C C A S C A C C T G A A C T C C T G G G A G A C C C T C A C T C T C C T C T C C C C A A A A C C A A G A T
 451 ----- 540
 T L H I S R I F E V T C V V V D V S H E D P E V Q F K N Y V
 A C C T T A T A T T T C C G A C C C C T G A G T C A C G T C G T G T G T G T G G A C C T G A G C C A G A G C C C C A G G T C C A G T T C A A G T T C A G T A C C G
 541 ----- 630
 D G V E V H S A K T K P R E E Q F W S T F R V V S V I T V L
 G C G G C G T G A G T G C A T A T G C C A A G A C A A G C C G G G G A G G A G A S T T C A A C A G C A C G T T C C G T G T G T C A G C C T C C T C A C C G T C C G
 631 ----- 720
 H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T
 C A T C A G G C T G G T G A A C G G C A A G G A G T A C A A G T G A A G G T C C A A C A A G C C C T C C C C C C C A T C G A A A A C C A T T T C A A A A C
 721 ----- 810
 E G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E N T E N Q V S L T C L V
 A A G G A C A G C C C C G A A C C A C A G G T G A C A C T T G C C C C A T C C C G G A C C A G A T G C C A A G A A C C A G T C A G C T G A C C T G C C T G G T C
 811 ----- 900
 K S F Y T S D I A V E W E S S G Q P E N N Y N T T P P W L D
 A A G G C T T C C C C A G C A C A T G C C C G T G A G T G G G A G A C S C G G G C A C C C G S A C A C A C T A C A A C A C C A C C T C C C A T G C T G G A C
 901 ----- 990
 E D G S F F L Y S K L T V D K S H W Q Q G N I F S C S V M H
 T C G A C C C T C C T T T C C T C T A A G A C A G C T C A C C S T G C A C A G A C A G C A G T G C C A G C A G G G A A C A T C T T C A T G C T C C G T G G A T
 991 ----- 1080
SapI
 E A L H N R F I Q K S I S L S P G K *
 G A G G T T C T C A C A C C C C T T C A G C A G A G A G C C T C C C C T G T C C C G G T A A T G A T A T C C A T C A C A C T G C C G G C C G T G G A G
 1081 ----- 1154

Figura 14

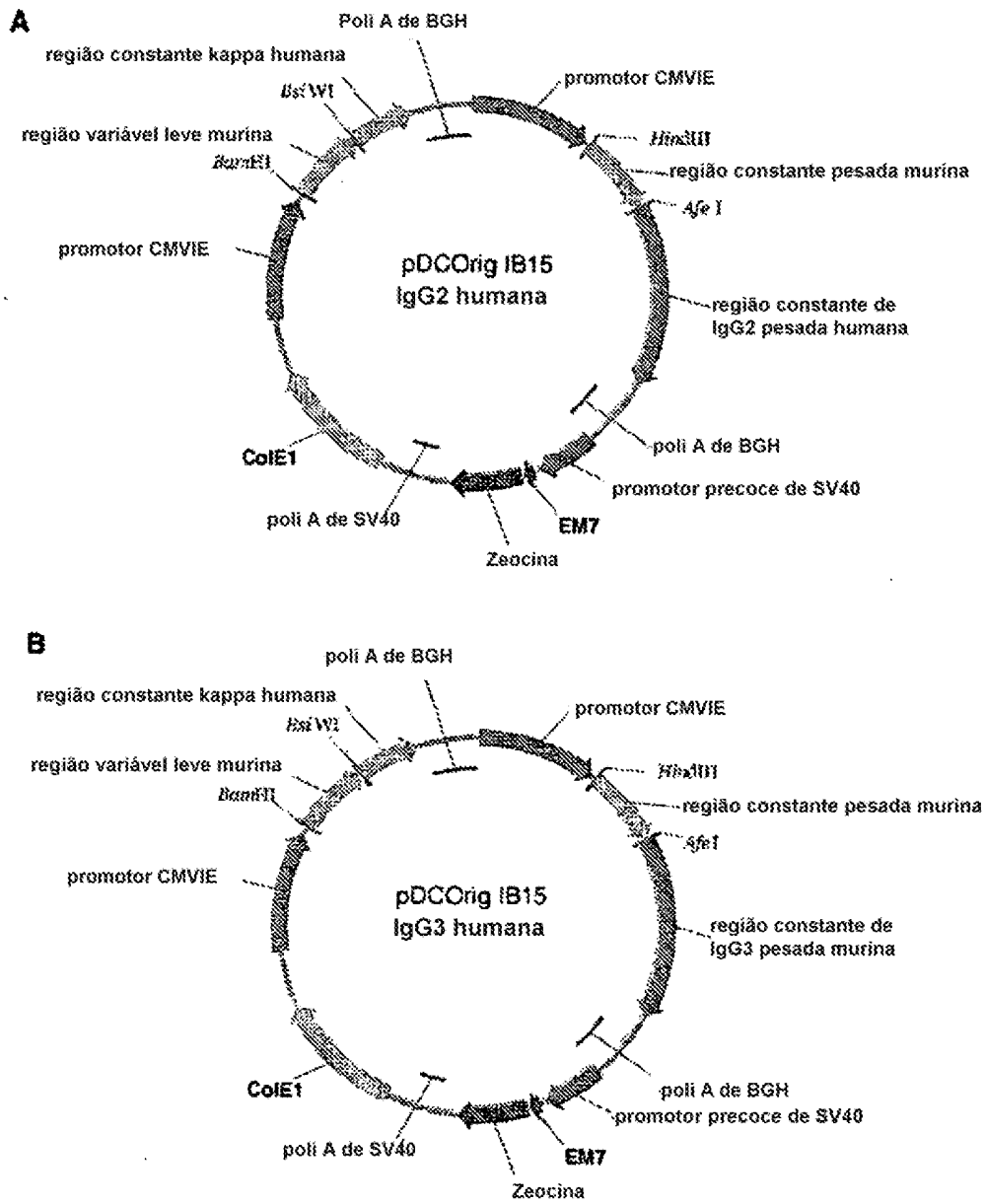


Figura 15

Cadeia pesada

90
 90
 180
 270
 360
 450
 540
 630
 720
 810
 900
 990
 1080
 1170
 1260
 1350
 1440

Figura 17

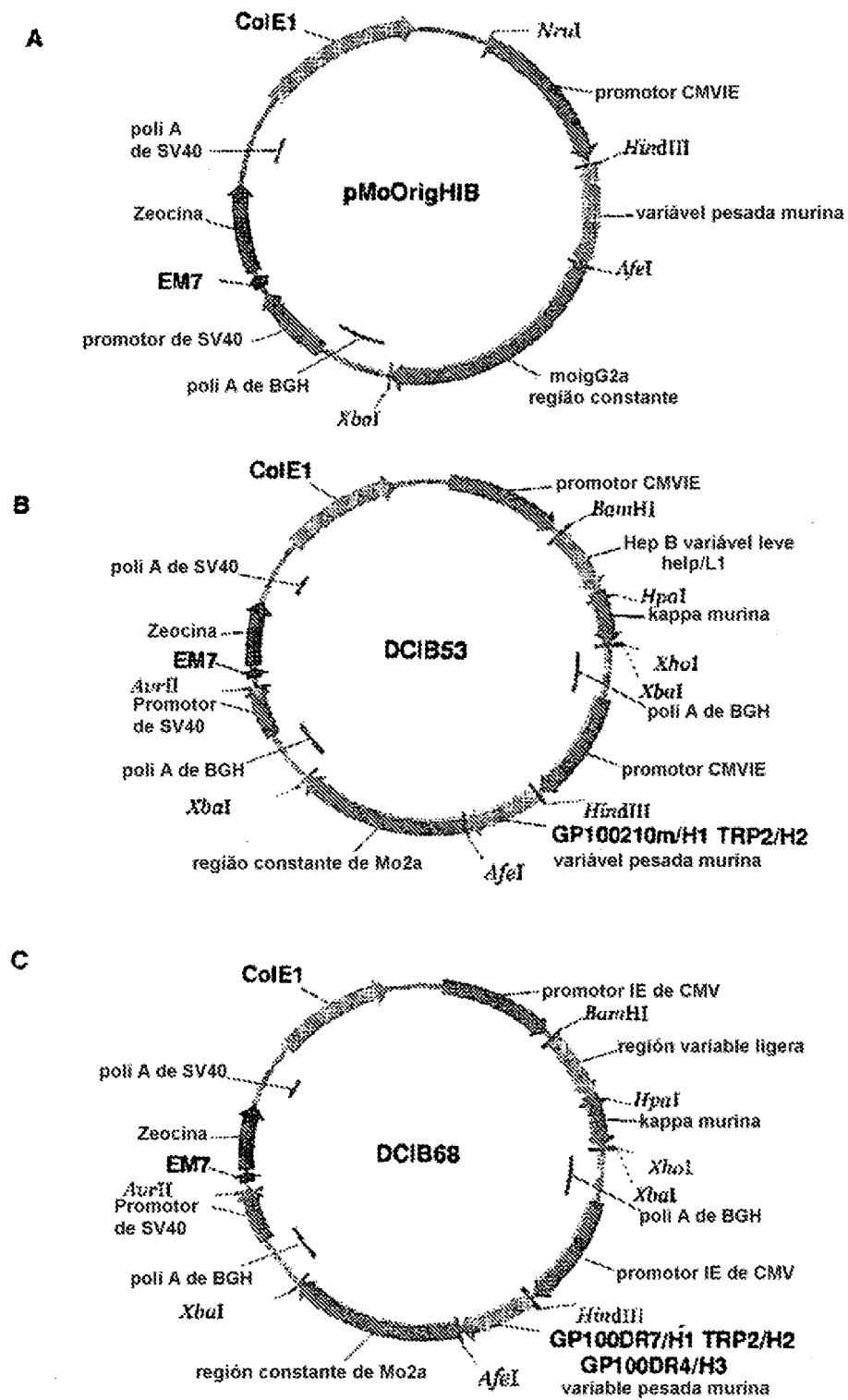


Figura 18

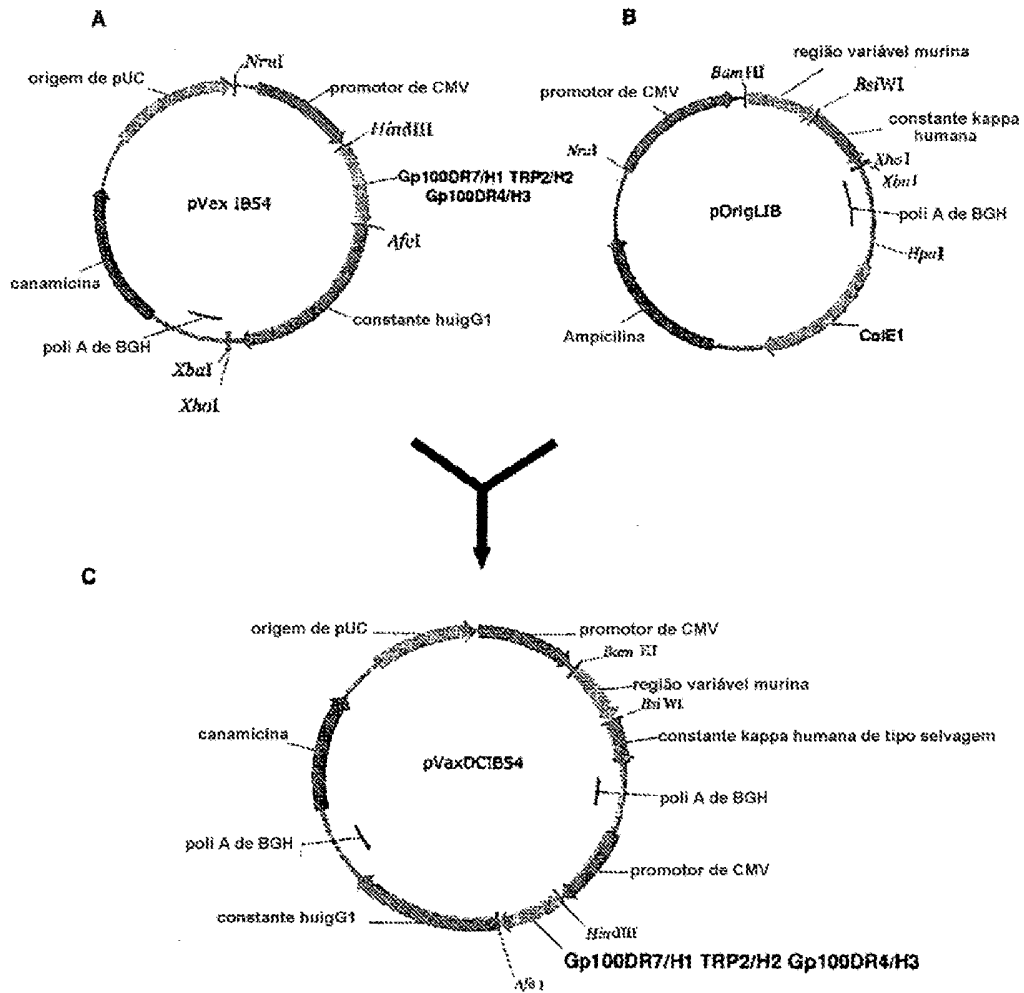
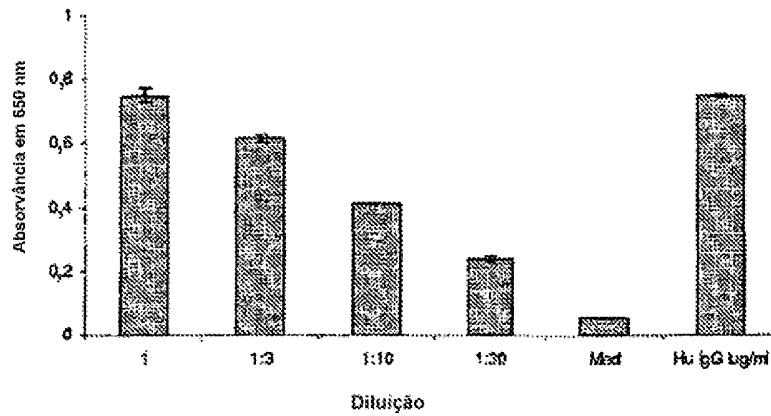


Figura 20

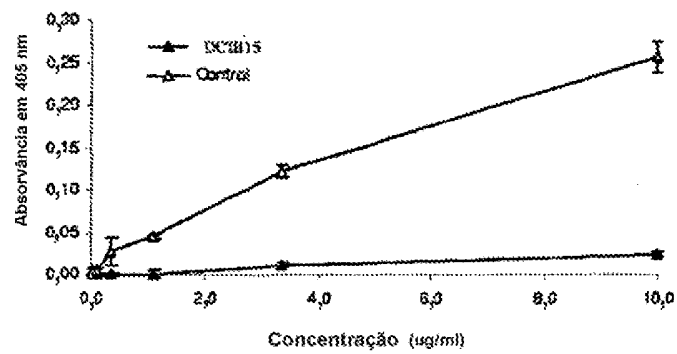
a.

Titulação de proteína IB com gp100/H1, TRP/H2, Hep B/L1 B em sobrenadante



b.

Titulação de proteína Immunobody DCB15 (cadeia pesada)



c.

Cadeia pesada de IB e expressão de anticorpo intacto

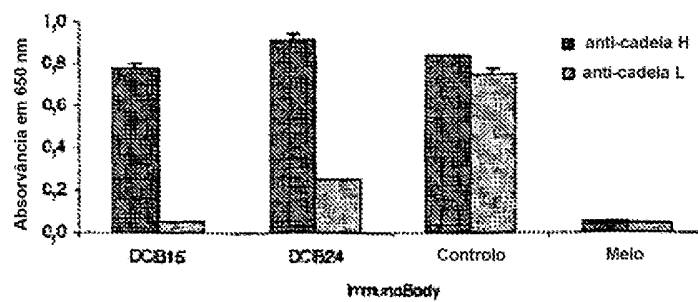
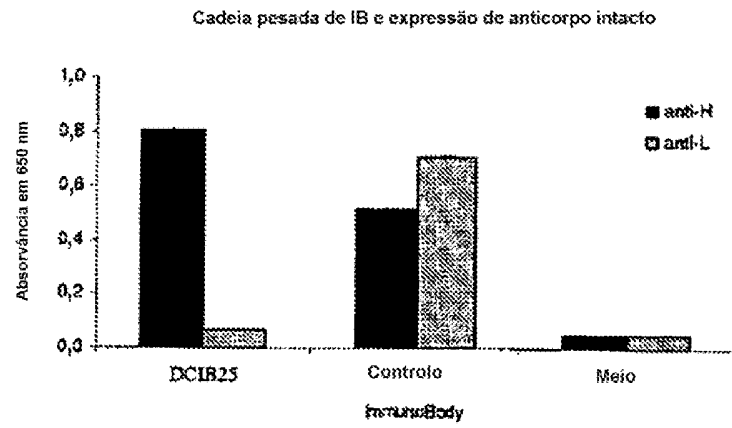
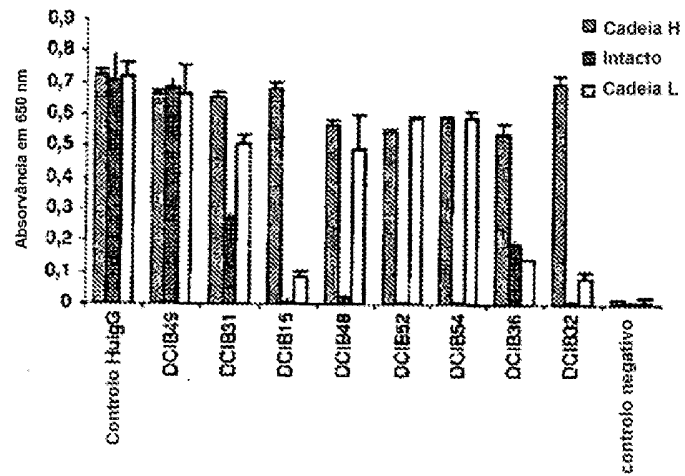


Figura 20 continuação

d.



e.



[illegible]

```

1  GGAATCCACCATGGGATGAGACTGTATCATCTCTTCTTCTGCTAGCAACGGCTACCGGAGTCCAGCTCCGATGCTGTTCATGACCCATCTTCA
91  LSLRPVYTFGEERAEIESCRHSQSLSVNSNGNTYLC
CTCTCCCTCCCTCTCTACCTCTGGGGAGCCACAGCTCTCTCTCTTCCAGATCTACTCAGAGCCCTGGTACATAGTAAATGGAAACACCTATTTA
181  ENYILQEFSSQSPQLLIYKVSNNRFSGVYVDHFQ
GAACTGCTACTCTGCAGAAACGAGGCCCTCTCTACACACTCTCTATCTCAAGAAGTTCACACCGATTTCTCTGGGTCCACAGACAGATTCACT
271  GCGSGCTDFTLKISRVEAESDTGVVYKY
GCGTGGATCCAGGCAAGATTACACTCAGAAATAGGACAGACTGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGGCTCTCTCTCAGCTTAT
361  RFPNAPILFEGGGRKVEIR
AGACACCAATCCCTCTATCTTATCTGGTGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCCTACG

```


Figura 24

Variável pesada

```

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V S T G
1 AAGCTTACCGATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAAACAGCTAAGAGTCCACTCCCGGGTACAGCTGGTGGAGACTGGG 90
-----

S G L I Q P G G S L R H S C A A S G F A F N T Y D M S W V R
91 GGAGGCTTAATCCAGCTGGAGGCTGCTGAGAAATGCTGTGACAGCTCTGGATTCGCTTCATACCTATGACATGTCTTGGGCTCGC 180
-----

Q A P D R G L E N I A Y I G S G S R T Y Y P D I V E G R F
181 CAGCTCCCGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGCTAGATGTGTATGTTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACTGTGTAGGGGGGATTC 270
-----

T I S R D H S K N T I Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R
271 ACGTTTCCAGAGACATAGCAAGACACCCGTATTTCGCAATGACAGCTGAGGCTGAGGACACAGCCGCTGATTACTGTGCCCCGA 360
-----

AfeI
361 S V Y D F P V W L W G Q S T I V T V S S 423
AGTGTITATGATTTTGTGTGCTCTGGGGCCAGGACGACGCTCAGCTCTCCAGCCGCT
-----

```

Variável leve

```

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L N T Q S P
1 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTTGGTAAACAGCTAAGAGTCCACTCCCGATCTGTGTATGACCACTCTCCA 90
-----

L S L P V I E G E P A S I S C R S S Q S L V R E W G N T Y L
91 CXTCCCTGCTGTACTCTGTGGGAGCCAGGCTCCCTCTCTCTCCAGATCTAGTCAGAGGCTGGTACATGTATGAGAACACCTATTTC 180
-----

E W Y L Q R P Q Q S P Q L L I Y K V S R R F S G V P D R F S
181 GAATGGTACCTGGAGAAACAGGCTATCTCCAGGCTCTGATCTACAAATTTCCAGCCGATTTCTGGGGTCCAGACAGATTCAGT 270
-----

G S G S G T D F T L K I S R V R A E D T G V Y Y C T P P A Y
271 GCGAGTGGATCAGGACAGATTTCAGACTCAGATCAGGAGGTGAGGCTGAGGATACCCGAGTGTATTACTGACTCTCCAGCTTAT 360
-----

361 R P P N R P I L F G G S T K V E Y K SaiWI 420
AGACCCCAATGCCCTATCTTATCCGTGGAGGCCACCAAGCTGGAATCAAGCCGACG
-----

```

Figura 25

Variável pesada

```

HindIII M G W S C Y L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AACTTACCAATGGGATGGAGCTGTATCAATCTCTCTGGTAGCAACACCTACCGGASTCCACTCCAGGTGACAGCTGTTGGAGACTGGG
1 ----- 90

G G L I Q P G G S L R M S C A A S G F A E N T Y D M R W V R
GMSGGTTAATCCAGCTGTGAGGGTCCCTGAGAAATGTCCTGTCAGGCTCTGGATTCCCTTCANTACCTGTGACATGCTTGGGTTCGC
91 ----- 180

Q A P S R G L E N I A V I G S G S D R Y Y P D I V R G R F
CAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATACATTGGTAGTGGTGGTATAGAACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTTC
181 ----- 270

T I S R D N S K N T L Y L Q L H S L R A E D I A V Y Y C A P
ACATTTCCAGAGCAATAGCAAGAACCCCTGTAATTCGAATTCACAGCTGTGAGGGCTGAGGACACAGCCGGTGAATTACTGTGCAGAA
271 ----- 360

H Y G H Y V D Y A V D E W G Q S T T V Y V S S
AFeI
CATTAAGTCTACTACGTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGTCAAGGAACCAAGTCAACCCCTCCAGCCCT
361 ----- 432

```

Variável leve

```

BamHI M G W S C Y L F L V A T A T S V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCAATGGGATGGAGCTGTATCAATCTCTCTGGTAGCAACACCTACCGGAGTCCACTCCAGTGTGTTGATGACCAATCTCCA
1 ----- 90

L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V R E N D N T Y L
CYTCCCTGGCTGTCACTCTCTGGGAGCCAGGCTCCATCTCTTGCAGAGCTAGTCAAGSCTGGTACATAGTAATGGGAACACTATTTA
91 ----- 180

E W Y L Q K P G D S P Q L L I Y K V S H R F S G V P D R F G
GAATGGTACCTGAGAAACTAGGCTAGTCTCCAGAGCTCTGATCTACAAAGTTCCACACCAATTTCTTGGGCTCCAGACAGATTCAAT
181 ----- 270

G S G S C T D F I L K I S R V E R E D T G V Y Y C S V Y D F
GGCATGTGATCAGGACAGATTTCACCTCTAGATCAGCAAGTGGGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGAGAGTATGATTTT
271 ----- 360

F V N E F G G C T K V E I K BstNI
TTTGTGTGCTCTCTCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATTCAGCGTACG
361 ----- 420

```


[illegible][illegible]

Figura 29

Variável pesada

```

HindIII  M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCATGGGATGGACCTGATCTATCTCTCTCTGGTAGCAACAGCTACCGAGTCCACTCCCGAGGTGACGCTGGTGGAGACTGGG
1 ----- 90

G G L I Q P G G S L R M S C G T S R A M L G T R I N E V I V
GGAGCTTAAATCCAGCTGGAGGGTCCCTGAGAGTCTCTCTGGGAGACAGCCAGGCAATCTCTGACACACACCATGGAAGTAAGTCTG
91 ----- 180

Y R W V R Q A P G K E L E W I A Y Y G S D G S V Y D F F Y W
TACCATTTGGGTTCCAGGCTCCGCGAGGGGCTGCACTGAGTCCATACATTGGTAGTCTCTGAGCTTTATGATTTTCTTGTGK
181 ----- 270

L S F I I S R N S K N T L Y L Q L U S L R A E D T A V I Y
CTCCGATTCACCTTTTCCAGAGACATAGCAAGACACCCCTGTATTTCCATTTGAAACAGCTCTGAGGGCTGAGGACACACCCCTGTATTAC
271 ----- 360

C A R W N R Q L Y P E W T E A Q R L D W G Q G T I V T V S S
TGTCCCGCTGGAGACAGGCACTGTATCCAGAGTGGACAGAGCCCGAGAGCTTGACTGGGGCCAGGTTACCAAGGTCCACCGTCTCCAGG
361 ----- 450

AfeI
GCT
451 --- 553

```

Variável leve

```

BamHI  M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
GGATCCACCATGGGATGGAGCTGATCTATCTCTCTCTGGTAGCAACAGCTACCGAGTCCACTCCCGAGGTGATCTCTGATGACCAATCTCCA
1 ----- 90

L S L P V T P G E F A S I S C R S Q S L V R S N G N T Y L
CTCTCCCTGCTCTCTCACTCTCTGGGAGGCGCCCTCTCTCTCTGAGATCTAGTCAAGAGCTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTA
91 ----- 180

E W Y L Q K P G Q S F Q L L I Y K V S N E F S Q V P D R F S
GAATGGTACCTGCAAGANACAGGCGCTCTCTCAGAGTCTCTTCTACAAAGTTTCCACACCGATTTCTCTGGGCTCCAGACAGATTCAGT
181 ----- 270

G S G S S T D F T L K I S R V E A E D T G V Y K C F O G E R
GCGAGTGGATCAGAGACAGATTTACACTCAGAGATCAGCGAGTGGAGCTTGAAGGATACCGAGCTGTATTCTGCTTTCAAGGTTCCAT
271 ----- 360

BsiNI
V P W T P G G G T K V E I K
GTTCTCTGAGACTTCCGGTGGAGGCAACCAAGTCCAAATCAGAGCTAGG
361 ----- 450

```


Figura 31

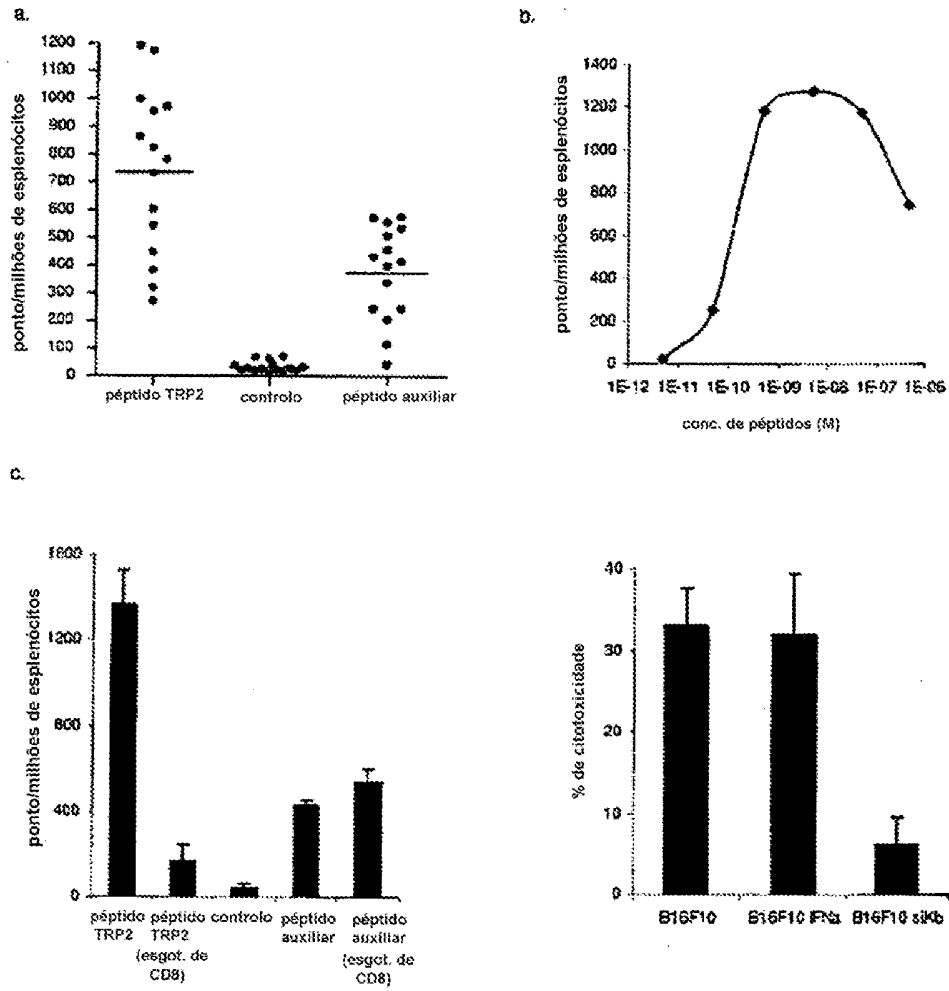
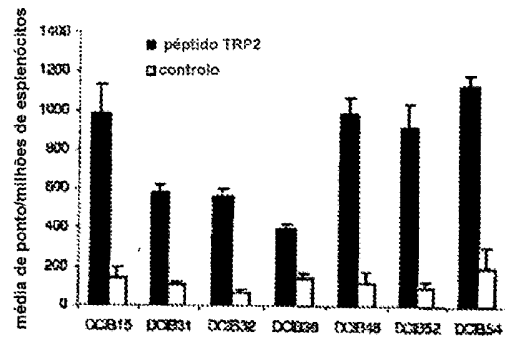
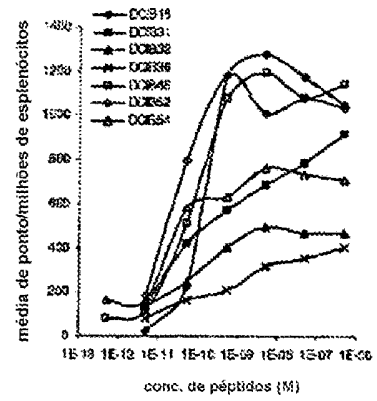


Figura 31 continuação

e.



f.



g.

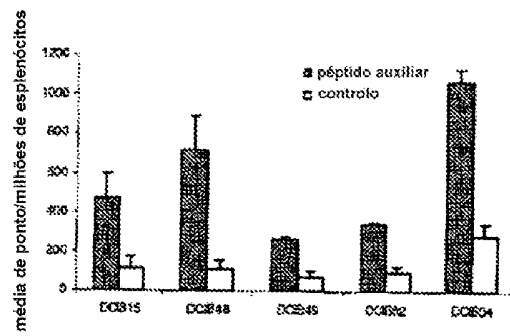


Figura 32

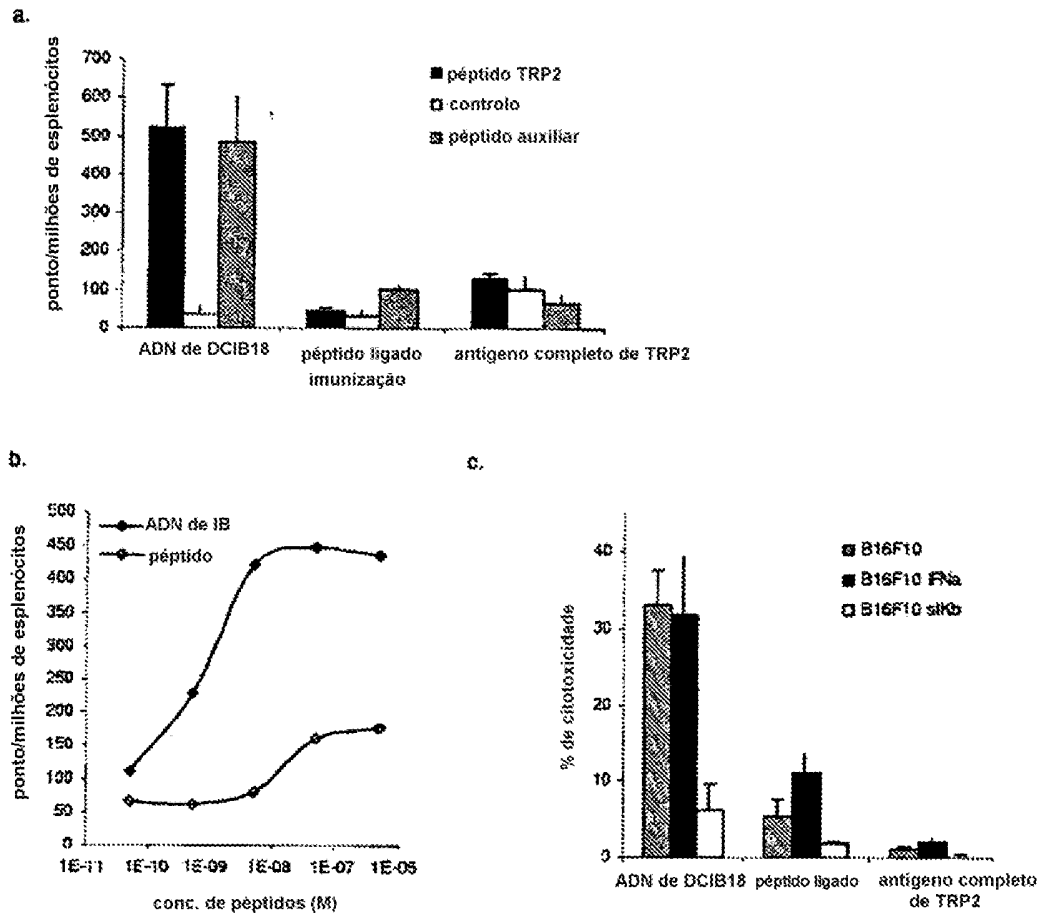


Figura 32 continuação

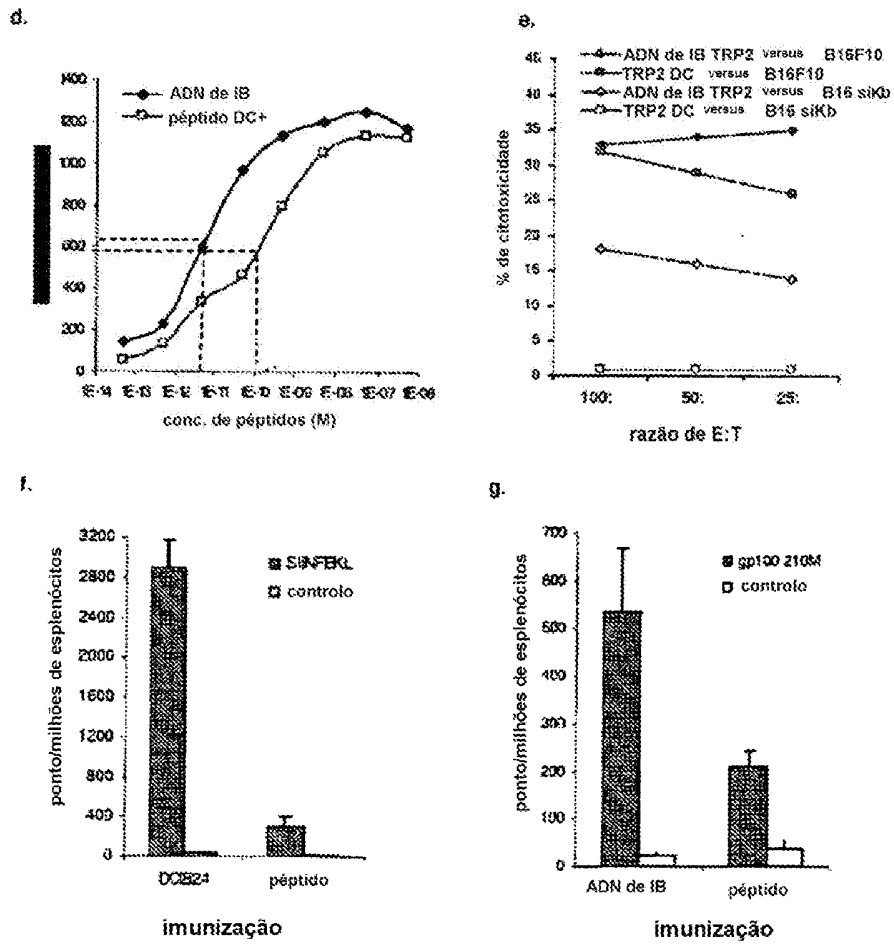
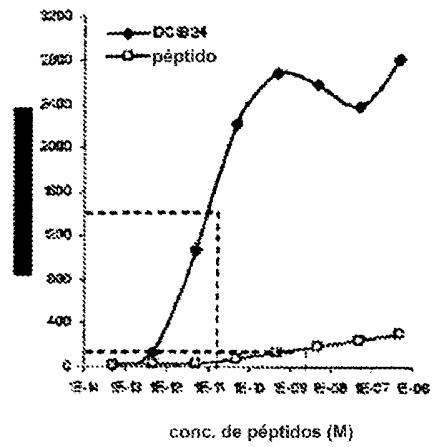


Figura 32 continuação

h.



i.

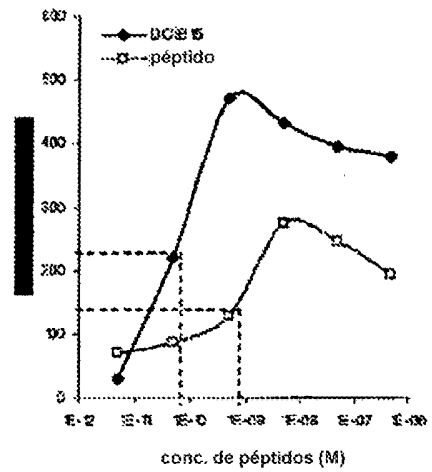


Figura 33

Variável pesada

HindIII M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q V Q I V E T G
 AAGCTTACCATGGGATGGAGGTGTATGATCCTCTCTCTGTAGCAACAGTTACCGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

1: G G L I Q F E G S L R M S C A A E G F A F N T Y D M S W Y R
 GGAGGCTTAAATCCAGCTGGAGGTCCTCGAGAATGTCTGTGCGAGCTCTGAGATTCCCTTTCAATACCTATGACATGTCCTGGGTTCCG
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

1: Q A P G K G L E W I A Y T S S G G T F Q E L D S W N T S L R
 CAGCTCCCGGGAGCGGCTCGAGTGCATCGCATACATTCTGTAGTGGTCTGATACCGGAGAGTCTAGACTCTGGTGGACTCTCTCCGA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

1: F T I S R D N G R N T L Y L Q I N S L R A E D T A V Y Y C A
 TTCACCATTTCCAGGACAAATGCAAGACACCTGTATTGTCAATTGACACATCTGAGGGCTGAGGACACACCCCTGTATTACTGTGCA
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

AfeI
 1: R R Y G H Y V D Y A V D Y N E Q G T T Y T V S S
 AGACATTATGGTCACTACGTCGACTATGCTGTGGACTACTGGGTCAGGAGACCCAGCTCAGCGTCTCCAGGGCT
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 435

Variável leve

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D V L M T G S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGGTGTATGATCCTCTCTCTGTAGCAACAGTTACCGAGTCCACTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGG
 1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90

L S L P V T E G E P A S T S C F E R F E I F P K S W Y L Q K
 CTTCCCTCCCTGCTCACTCCCGAGGACCCCTCATCTCTTGGTTTGAAGGTTTGGGATATTCCACAGGAATGGTACCTGCGGAA
 91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180

F G Q S P C L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S S S G T
 CCAGGCCAGTCTCCACAGCTCTGTATGTACAAAGTTTGGACCGATTTCTGGGGTCCCGACAGATTTCAGTSSCAGTGGATCAGGACA
 181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

G F T L R I S R V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P N T F G
 GATTTCACACTTAAGATCAGTCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACATGTTCCCTGGACGTTCCGT
 271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

BsiNI
 1: S S T K V E I K
 GGAGGCCCAAGGTGCAAAATCAGCGGTACG
 361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 390

Figura 34

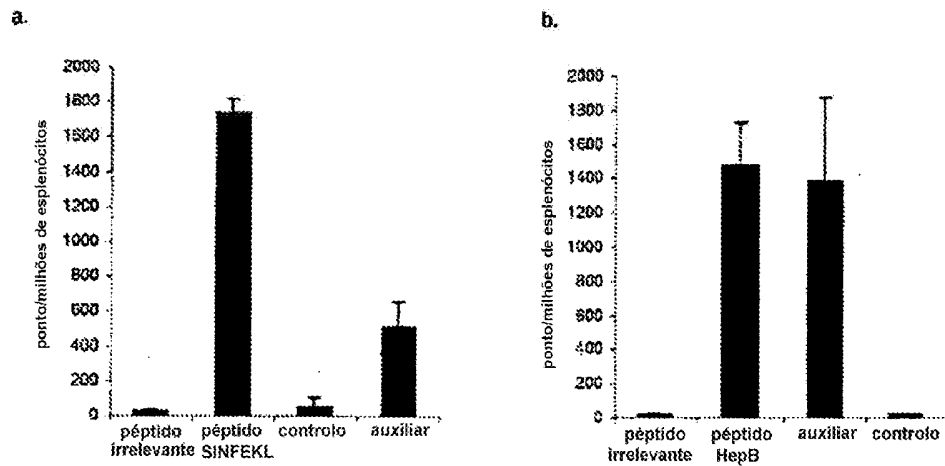


Figura 37

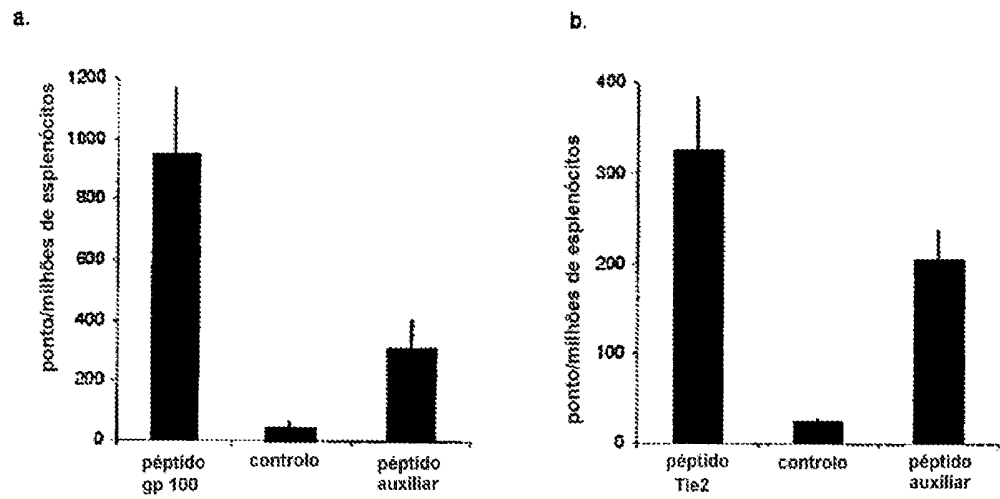
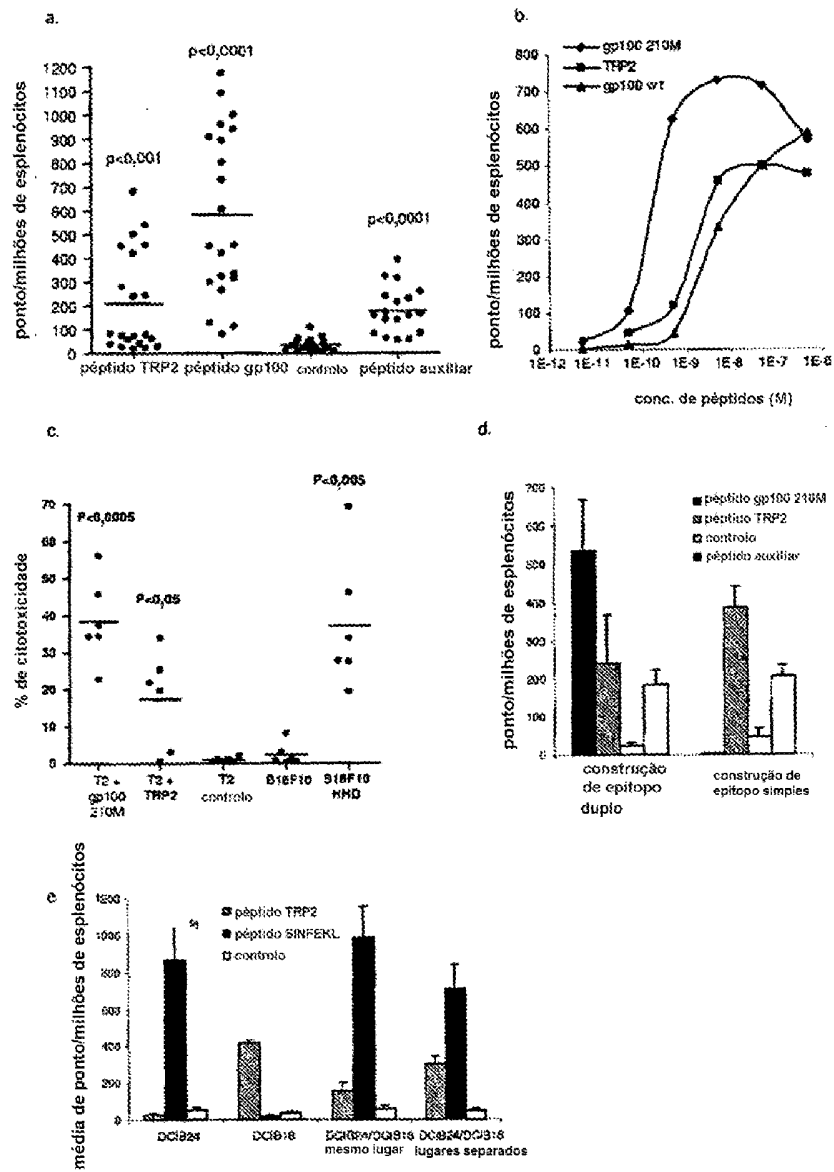


Figura 38



[illegible][illegible]

Figura 40

Variaável pesada

[illegible]

Variável leve

```

Seq#11  M G W E C I I L F L V A T A I G V N S D V L M T Q S P
GGATCCACCGATGGGATCGGCTGTATCATCTCTCTCTTGGTACCAACAGCTACCGGAGTCCACTCGATGTGTGATGACCCATCTCCA
1 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 95

      L L L P V T P C E F A S I S C T P P A I R P P N A P I L W Y
CTCTCCCTGCTCTCATCTCTCTGGGAGCCAGGCTTCATCTCTGCTCTCTCCAGCTTATAGACCAACCAATGCCCTATCTCTGGTAT
91 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 185

      L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R P S G S G
CTGCAGAACACAGGAGCTCTCTCCAGCTCTCTGATCTACAAGTTTCCAGCACTTCTCTGGGCTCCAGACAGATTCTATGGCACTGGA
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270

      S S T D P T L K I S H V E A E D T G V Y Y C F Q G S H V P W
TCAGGACAGATTTCACGCTCAAGATCAGCGAGATGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTCAAGCTTCATCTCTCCCTGG
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360

      T E G G G T K V N S N Seq#11
AGGTTGGTGGAGGACCAAGGTTGGGAATCAAGGGTACG
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 455

```

Figura 41

Variável pesada

[illegible]

Variável leve

[illegible]

Figura 42

Variável pesada

```

#IndIII  M G W S C I L F L V A T A T G V H S Q V Q L V E T S
1  AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTCTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGAGGTGGAGCTGGAGAGCTGGG  90

      G G L I Q P G G E L R M S C T T I T D Q V P Y R V N V R Q R P
91  GGAGGCTTAATCCAGCTGGAGGATCCCTGAGGATCTCTCTGACCATTTACTGACAGGTGGCTTACTCCCTTGGGTTCCGCGAGCTCCG  180

      G K G L E W I A Y I G S G S D R T Y Y P D T V K G R F T I S
181  GGGAGGCGCTGGAGTGGATCCGATACATGGGTAGTGGTGGTGGATGAACTACTATCCAGACACTGTGGAGGGCCATTCACGATTCG  270

      E D N S K N T L Y L Q L D S I H A E D T A V Y Y C A R H Y G
271  AAGAGCAATAGCAAGAACCCCTGTATTTCGAATTAACAGCTCTGAGGAGCTGAGGAGCAAGCCGTGTATTACTGTCCAGAGCATTAATGCT  360

                                     AfeI
361  H Y V D Y A V D Y W G Q G T T V T V S S
      CCTACCTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGTCAAGGAGCAACCGTCAACCGTCTCCAGCGCT  423

```

Variável leve

```

#BamHI  M G W S C I L F L V A T A T G V H S D V L M T Q S P
1  GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTCTGGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGATGTGTGATGAGCCCAATCTCCA  90

      L S L P V T P G E P A S I S C T T P P A Y H P P H A P I L W Y
91  CTTCTCCCTGGCTGCTGCTCTGGGAGGAGGCTCTGATCTCTTGGACTCTCTCCGCTTATGAGCCACCAATGGCCCTATCCTATGCTAT  180

      L Q N P G Q S P Q L L I Y K Y S N H F S G V P D R F S G S G
181  CTGCAAAACAGGCGAGCTCTCCAGAGCTCTGTATCTACAAAGTTTCTGACCGATTCTCTGGGCTCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGG  270

      E S I D E T L K I S R Y H A E D T G V Y Y C E F Q G S E V P W
271  TCAGGGACAGATTTCACACTCAGCATCAGCAGATGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTGCTTCAAGGTCACATCTCTCCGTTG  360

      I F G S G T R V E I K A2RII
361  AGCTTCGGTGGAGGACCAAGTGGATATCAAGCGTAGG  396

```


Figura 44

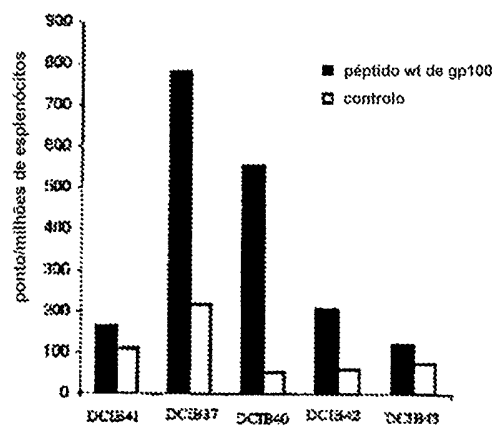


Figura 45

Variável pesada

```

84811111 M G W E C I L L F V A T A T S Y H S Q V Q L V E T G
AAGCTTACCATGCGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTTTGGTAGCAACAGCTACC GGAGTTCCTACTCCGAGTSCAGCTGGTGGGAGCTGGG
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----! 90

G G L I Q P G G S L R N S C T I M S Q V P F S V N V R Q A P
GGAGGCTTAATCCAGCCTGGAGGFKCCTGGAGATGTCTTG ACCATTATGAGCACAGGTGCCCTTCTCTGGTGTGGGTGGGAGGCTCGG
51 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----! 180

G K G L E N I A Y I G G G G S V Y D F F V W L R F T I S R D
GGCAAGGGGCTGGAGTGGATGCATACATCGGTAGTGGTGGT AGTGTTTATGATTTTTTGGTGGGCTGATTCGATTTCCAGAGAC
191 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----! 270

D S K N T L Y L O L N S L R A E D T A V Y Y C A E N Y G H Y
AATGCAAGAGACCTGTATTTCGAATTGACAGCTCGAGGGCTGAGSACACACCGGTGTATTACTGNGKAGACATTATGGTCACTAC
271 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----! 360

                                     AfaI
V D Y A Y D Y W G Q G Y T V T V S B
GTGGACTATGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGTACCAAGGTACCGCTCTCCAGCGCT
361 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----! 417

```

Variável leve[illegible]

Figura 46

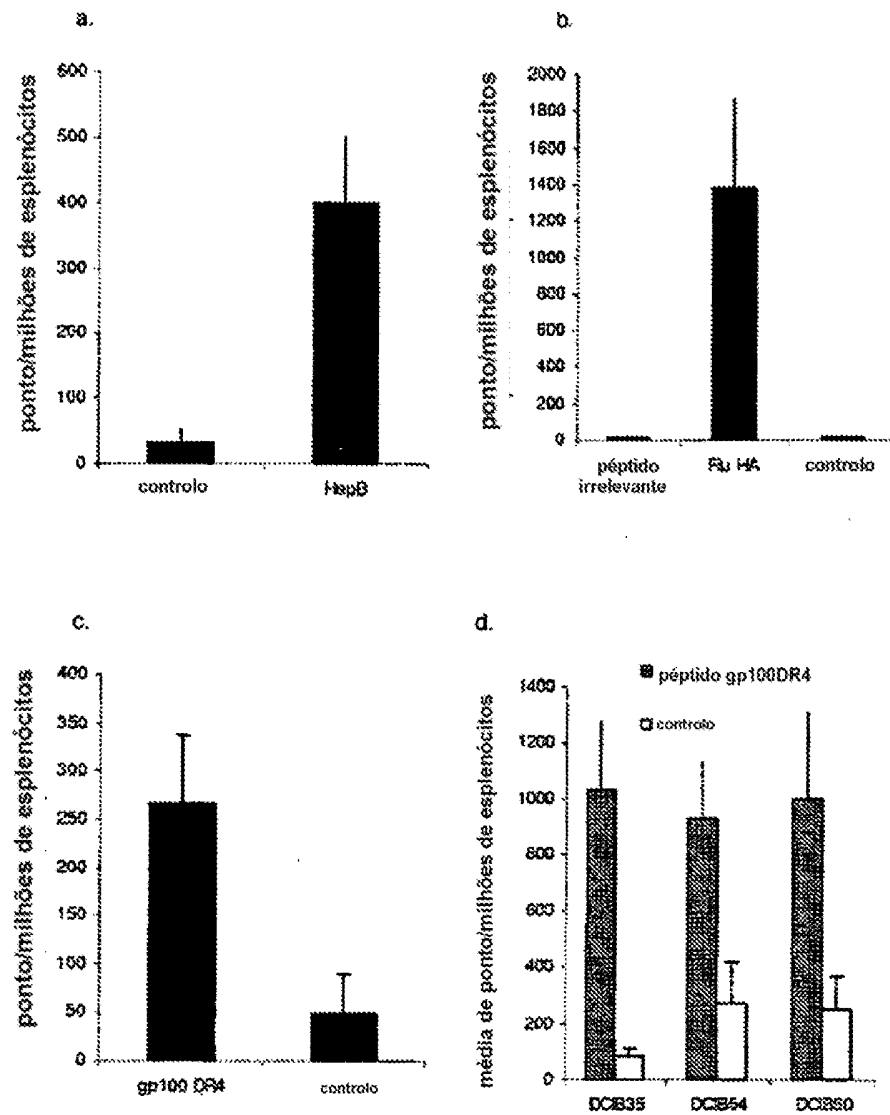


Figura 47

Variável pesada

HindIII M G N S C I T L F L V A T A Y G V R S Q V Q L V E T G
 AAGCTTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTCTGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGAGGTGCACTGGTGGAGACTGGG
 1 ----- 90
 G G L I Q P G G S L R M S C T L M D Q V P F S V W V R Q A P
 CGAGGCTTAATCCGCGCTGGAGGCTCCCTGAGAGTGTCTG ACCATTATGGACCGAGTGCCTTCTCTCCGTG GGGGTTCGGAGGGCTCCG
 91 ----- 180
 G K G L S W I A Y I G S G G S V I D F F V W L R F T L R D
 GAGAGGGGCTGGAGTGGAGCGCTACATTTGTTAGTGTGTATGTTTATTTTGTGTGGCTCCGATTCCATTTCAGAGAC
 181 ----- 270
 N S K N T L Y L Q L N S L R A E D T A V Y Y C A R R H Y G H Y
 AATAGCAGAGACACCTGTATTTGCAATTGACAGCTCTGAGGCTGAGGACAGAGCCGTATTACTGTGCGAGACATTTAGGTCACTAC
 271 ----- 360
 V D Y A V D Y N G Q G T F V T V S S
 GYGACTATGCTGTGGACTACTCGGGTCAAGCTACCGAGGTCAGGTTTCAAGCGGT
 361 ----- 417

Variável leve

BamHI M G N S C I L F L V A T A Y G V R S E D V L M T Q S P
 GGATCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTCTCTGTAGCAACAGCTACCGGAGTCCACTCCGAGGTGCACTGGTGGAGACTGGG
 1 ----- 90
 L S L P V T S G E P A S I S C H S S Q S L V H S N G E T Y L
 CTCTCCCTGCTGTCTACTCTCTGGGAGGCGAGCTCTCATCTCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCCTGGTACATAGTANTGGAGACAGCTATTTA
 91 ----- 180
 E W Y L Q K P G Q S V Q L L I Y R V S N R E G G V P D R F S
 GAATGCTACTGCGAGAACCCAGGCGAGCTCCACAGCTCTGCAATACAGAGTTTCCAGCCGATTTCTGGGCTCCGAGACAGATTCACT
 181 ----- 270
 G S G S C T D F T L R I S R V E A E D T G V Y Y C W H R Q L
 GGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATACCGAGTGTATTACTGCTGGAGACAGGACGCTG
 271 ----- 360
 I P E N T E A Q R L D F G G G T K Y E I K
 TATCCAGAGTGGAGCAGAGCCAGGAGCTTGACTTCGTGGAGGCGAGCAGGTGGAGATCAGAGCTACG
 361 ----- 429

Figura 48

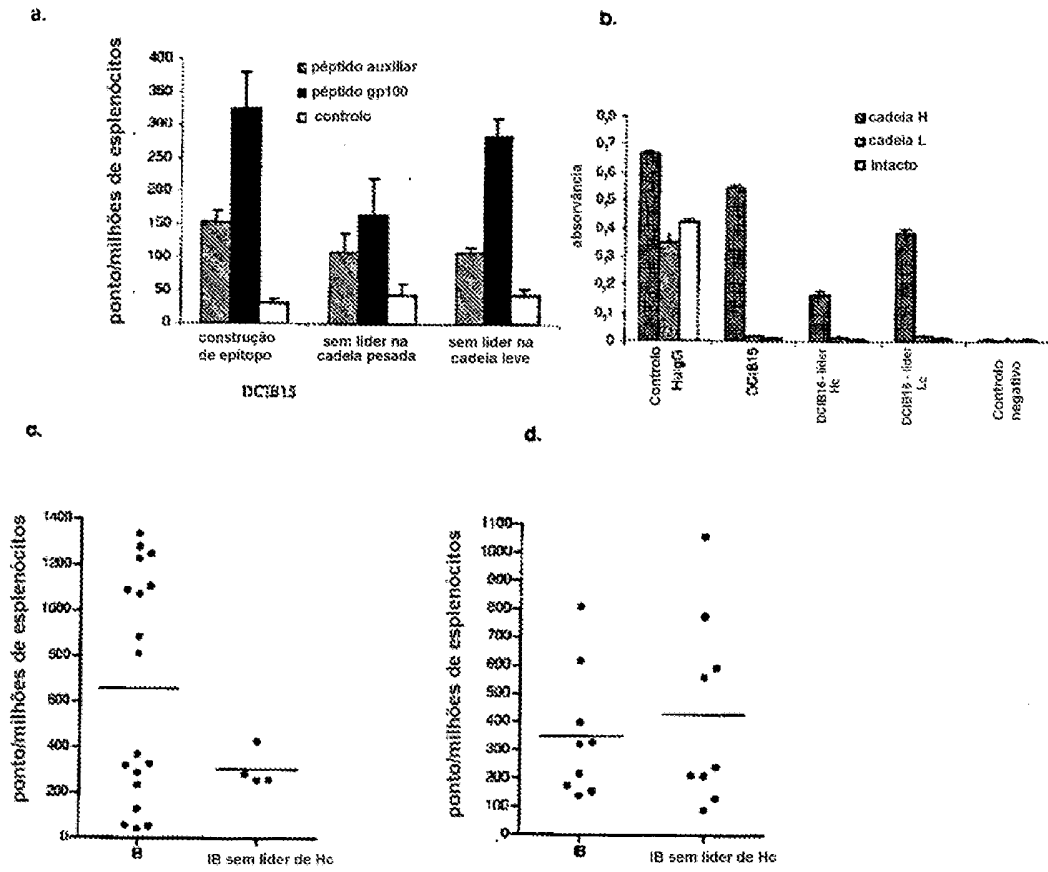


Figura 49

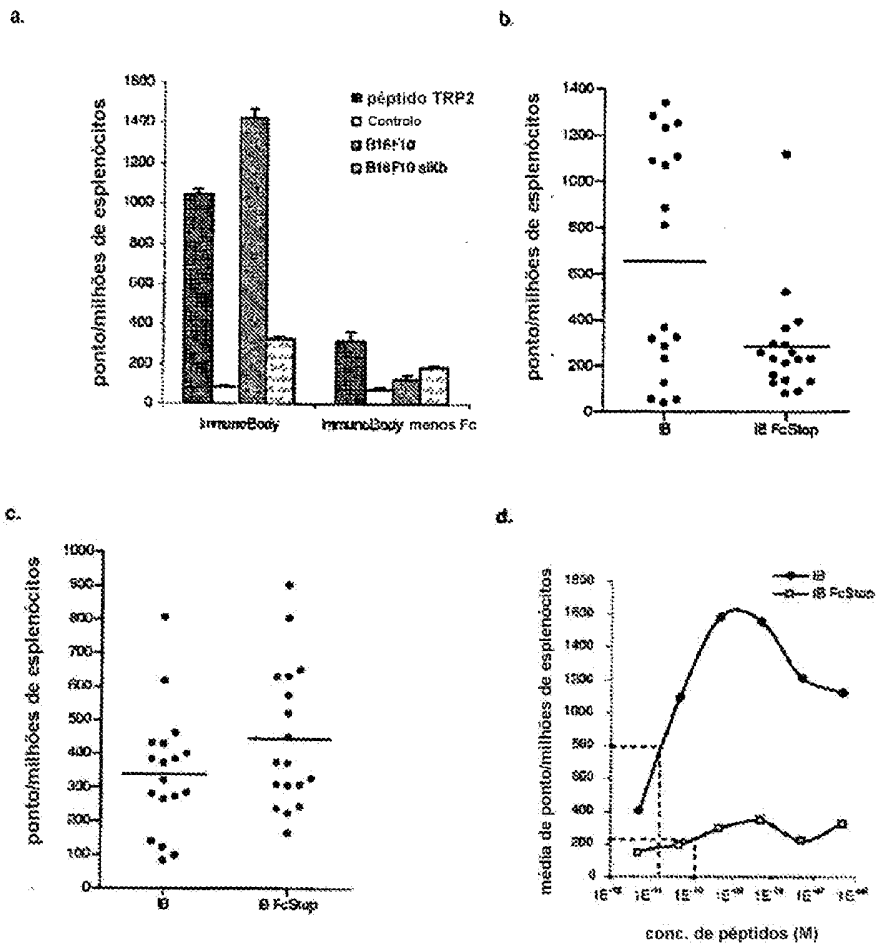


Figura 49 continuação

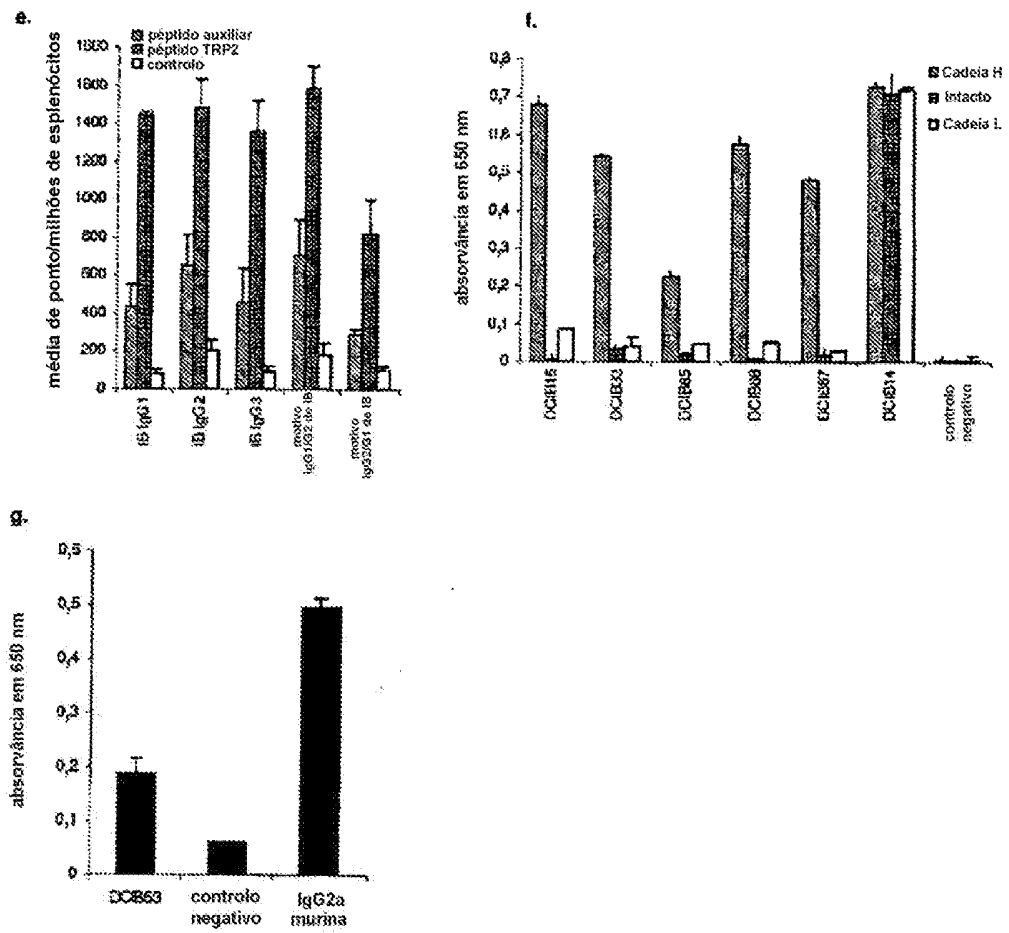


Figura 50

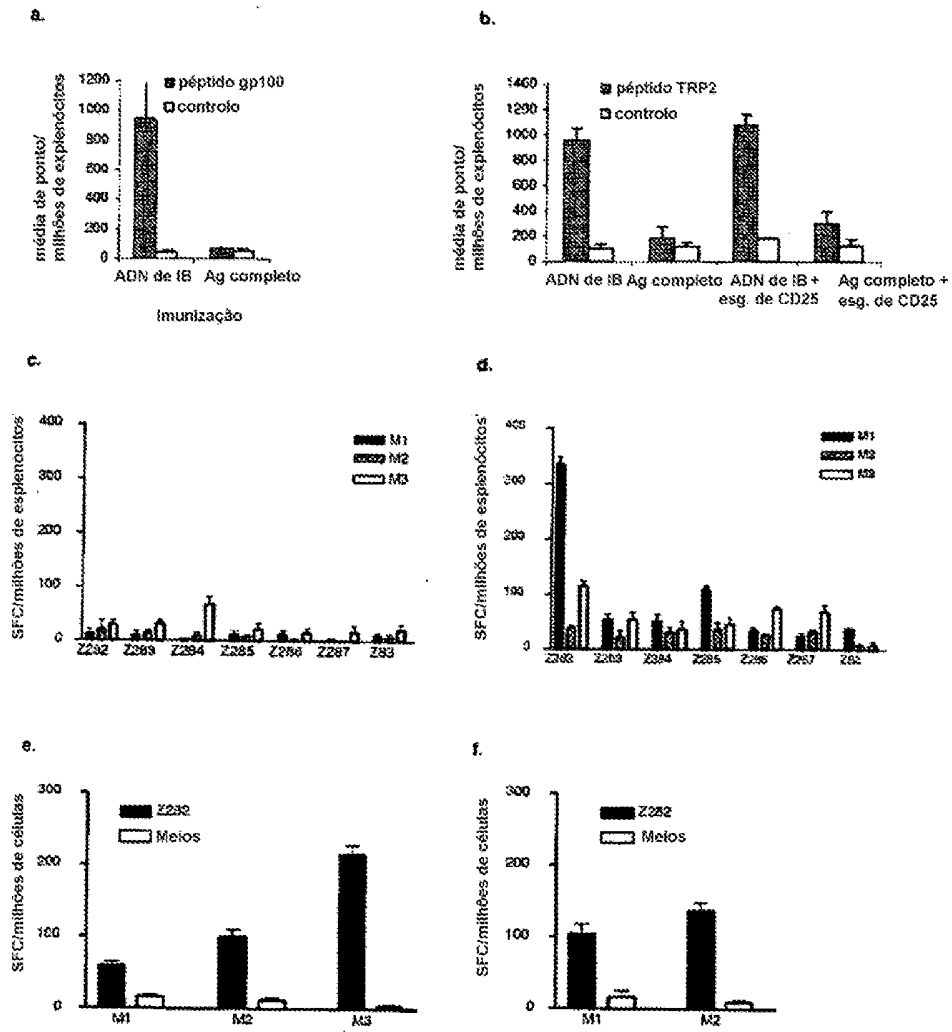
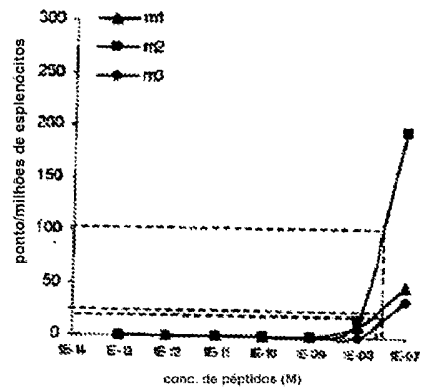


Figura 50 continuação

g.



h.

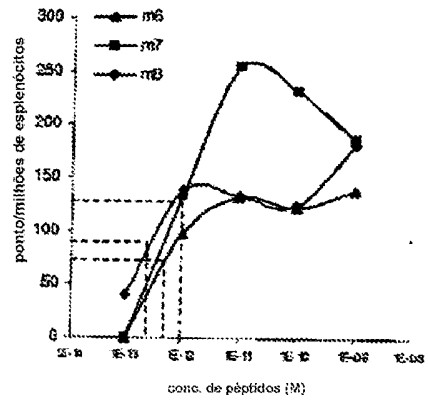


Figura 51

Variável pesada

```

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040

```

Variável leve

[illegible]

Figura 52

Variável pesada

[illegible]**Variável leve**[illegible]

Figura 53

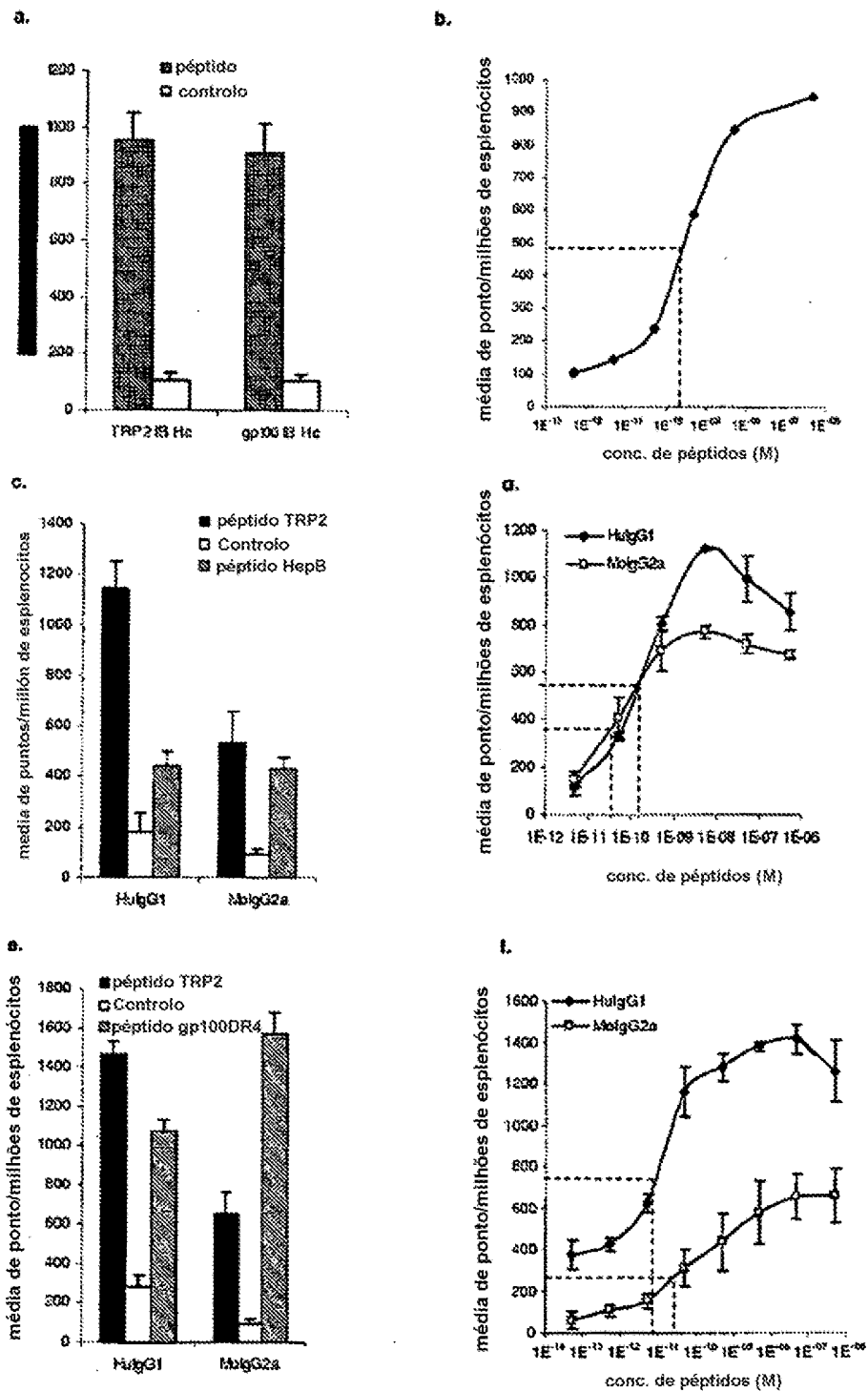


Figura 54 continuação

Cadeia leve

```

BamHI  M G S S C I I L F I V A T A T G V H S D V L M T D S P
1  -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 90
   G G A T C C A C C A T G G A T G G A G C T G T A C C A T C C T C T C T T G T A G C C A C A G C T A C C S S A G T C C A C T C C G A T G T G T G A T G A C C A A T C T C C A
   I 3 L P V T P G H P A S I S C T P F A Y R P P H A P I L W Y
91  -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 180
   C T C T C C C T C C C T C T C A C T C C T G G S A G C C A G C C T C G A T C T C T T G A C T C K I C C A G C T T A T A G A C C A C A A A T C C C C T A T C C T A T G G T A T
   L Q R P G G Q S F Q L L I Y K V S N R F S G V P D S F S G S G
181 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 270
   C T G C A S A M C A G C C A G C A G T C C A C A G C T C C T G A T C T A C A A G T T T C C A C C G A T T T T C T G G G T C C C A G A C A G T T C A G T G G C A G T G G A
   S S T D F Y L K I S R V S A E D I G V Y Y C F Q G S H V P W
271 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 360
   T C A G S G A C A G A T T C A C A C T C A A A T C M A C A G A T G S A G S C T G A S A T A C C G S A G T A T T A C T G C T T C A A G S T T C A C A T G T T C T G G
   Y F S G G T K V E I R A D A A A P T V S I F P P S S E Q L T
361 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 450
   A C G T T C G S T G G A C C C A C C A G G T T G A A T T A A G C G T G C A G A T G C T G C A C C A C T G T A T C G A T C T T C C A C C A T C C A G T G A G C A C T T A C A
   S G G A S V V C F L N F Y P K D I H V E W K I H G S E R Q
451 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 540
   T C T G A C G T G C T C A A T G G T G C T T C T T S A C A C T T C T A C C C A A A G A C T C A A T G T C A A G T G G A A G S T T G A T G C A S T G A A C G A C A A
   N G V L N S W T D Q Q S K U S T Y S M S S T L T L Y K D E Y
541 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 630
   A T G T G G T C T T A C A C A G T T G A C T G A T C A G A C A G C A A G A C A G C A C C T A C A G C A T C A G C A G C A C C C T C A C G T T G A C C A G C A G C A G T A T
   E K H N S Y T C E A T H K T S T S P I V R S F N R N E C *
631 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 720
   G A A C G A C T A A C A C T A T A C C T G T G A G G C A C T C A A G A C A T C T A C T T C A C C C A T T G T C A A G A C G T T C A C A G S A T T G T G T A G C T C
XhoI
GAGCTAGA
721 -----!-----!-----!-----!-----!-----!-----!-----! 729

```


Figura 55 continuação

Cadeia leve

BamHI M G W S C I I L F L V A T A T G V N S D V L M T Q S F
 1 GGATCCACCATGGGATGAGCTGTATCATCTCTCTCTGTAACCAACAGCTACCGGAGTCCACCTCCGATGTGTGTGATACCCAACTCCG 90

L E L P V T P G E F A S I S C R S S Q S L V H S H G N T Y L
 81 CTCTCCCTGCTGTACACTCTGGGAGCCGACCCCTCATCTCTGAGATCTAGTCAGAGGCTGGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTC 150

E N Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V D D S F S
 181 GAATGGTACTGTGCAAAACCCAGCCAGCTCTCCACAGCTCTGTATCTACAAAGTTTCCAGCCGATTTTCTGGGATCCAGACAGATTTCAT 270

G S G S S T D E T L K I S B V E A E D T G V Y Y C P Q G S H
 271 GCGAGTGGATCAGGSCAGATTTCACACTCAGATCAGGCAAGTGGAGGCTGAGGATACCGGAGTGTATTACTCTCTTCAGGTTTCAT 360

ClaI
 V P W T F G G G T K V E I E R A D A A P T V E I F P P S S E
 361 GTTCCGTGAGCTTGGTGGAGGACCGAGGTGGAAATCAAGGCTGCAGAGCTGCAGCAACTGTATCGGATCTCCACCAATCCAGTGG 450

HpaI
 Q L I S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V N H I D S
 451 CAGTAACTCTGGAGGTGGCTCAGTCTGTGGCTTCTTGAACAACTTACCCCAAGACATCATGTGTCAAGTGGAGATTGATGGCAGT 540

E R Q N G V L N S W X D Q D N E D S T V S N S S T L Y L T R
 541 GATCGACAAATGGCGTCTTGAACAGTTGGACTGATCAGACAGCAAGACAGCCCTACAGCATGACAGCAGCCCTCAGCTTGAACAG 630

D E V E R H N G Y T C E A T H H Y S T S F I V N S F H R N E
 631 GACGAGTATGAACGACATACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCTACTTCACCCATTTGTCAAGAGCTTCAACAGGATGAG 720

C * XhoI
 TGTACGCTCGAGTCIARA
 721 ----- 738

Figura 56

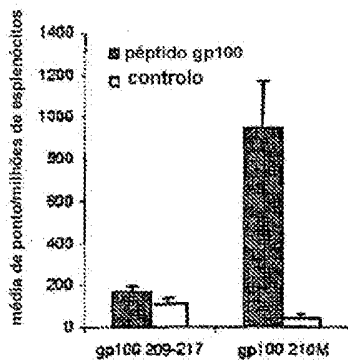


Figura 57

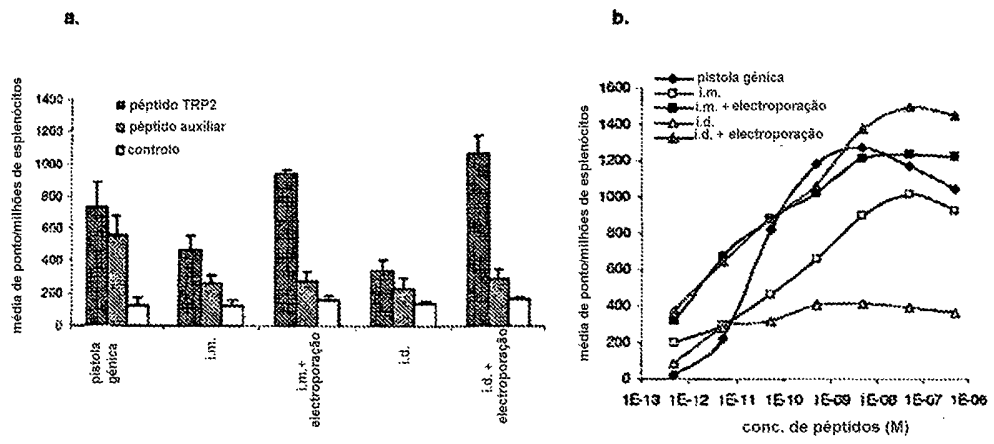


Figura 58

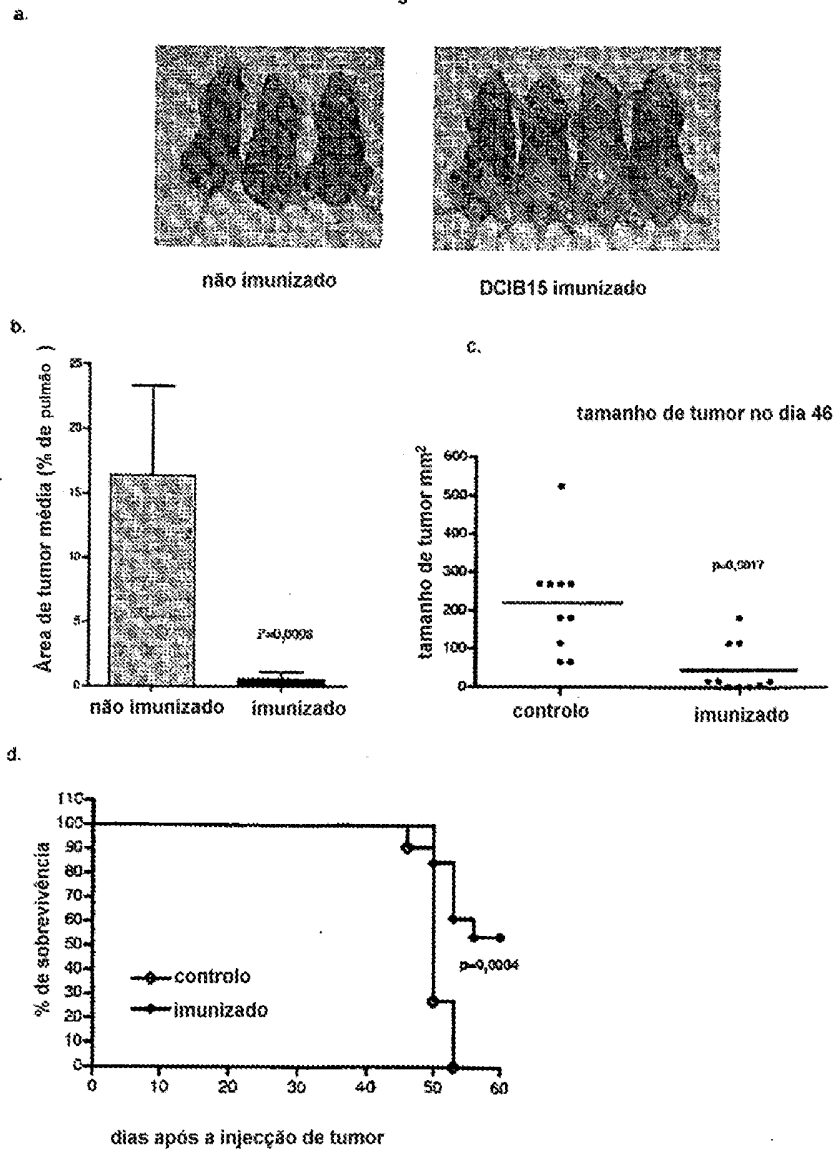


Figura 59

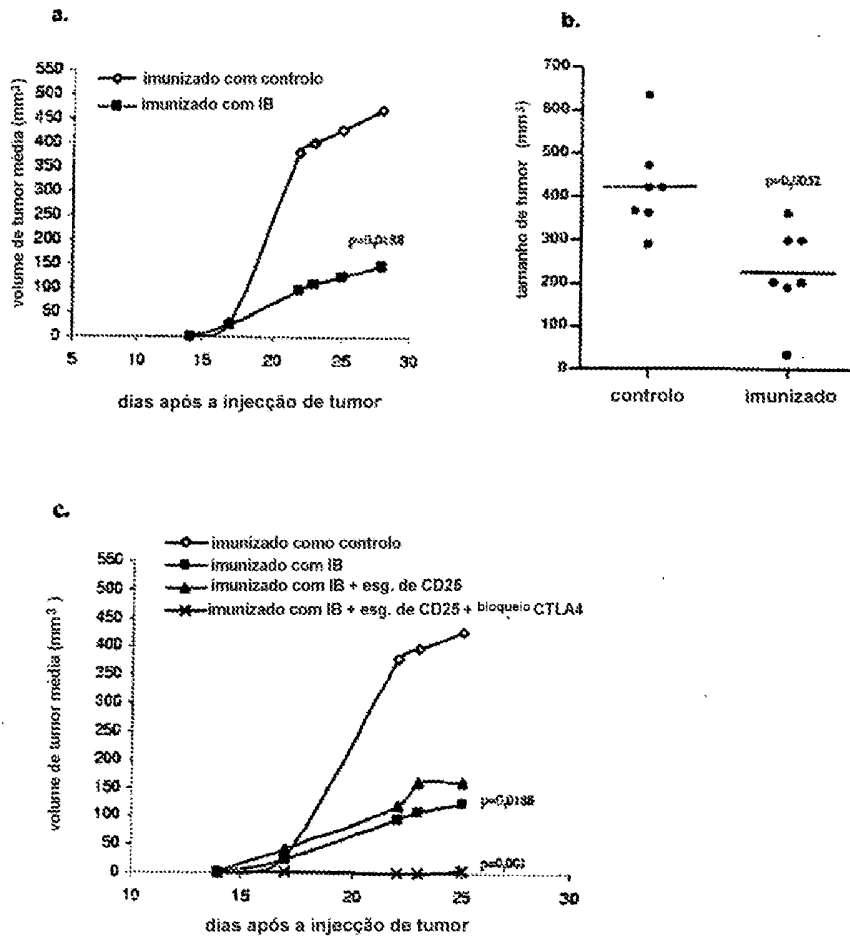


Figura 61

