

(11) Número de Publicação: **PT 2358755 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/28 (2015.01) **A61K 39/395** (2015.01)
A61K 35/00 (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.11.18	(73) Titular(es): ELI LILLY AND COMPANY LILLY CORPORATE CENTER, INDIANAPOLIS INDIANA 46285 US
(30) Prioridade(s): 2008.11.21 US 116825 P 2009.06.24 US 219903 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.08.24	(72) Inventor(es): JULIAN DAVIES US LING LIU US JIRONG LU US PETER EDWARD VAILLANCOURT US MARK ANDREW WORTINGER US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.09.02 222/2015	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS DE C-MET**

(57) Resumo:

SÃO PROPORCIONADOS ANTICORPOS MONOCLONAIS, FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO DESTES, E COMBINAÇÕES DOS ANTERIORES, QUE SE LIGAM A, E INIBEM A ATIVIDADE DE, C-MET E QUE SÃO EFICAZES EM TRATAMENTO DE CANCROS E OUTRAS DOENÇAS, DISTÚRBIOS OU CONDIÇÕES ONDE A PATOGÉNESE SEJA MEDIADA POR C-MET.

RESUMO

"ANTICORPOS DE C-MET"

São proporcionados anticorpos monoclonais, fragmentos de ligação ao antígeno destes, e combinações dos anteriores, que se ligam a, e inibem a atividade de, c-Met e que são eficazes em tratamento de cancros e outras doenças, distúrbios ou condições onde a patogénese seja mediada por c-Met.

DESCRIÇÃO**"ANTICORPOS DE C-MET"**

O presente invento refere-se a anticorpos que se ligam a c-Met e à sua utilização em tratamento de condições e distúrbios onde a patogênese é mediada por este recetor.

c-Met, um membro da superfamília das tirosina-cinases, é o recetor para o Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF). A ligação de HGF a c-Met leva à dimerização ou multimerização do recetor, fosforilação de múltiplos resíduos de tirosina na região intracelular, ativação catalítica, e sinalização a jusante. c-Met é também ativado através de mecanismos independentes do ligando, incluindo sobre-expressão, amplificação, e mutação do recetor. A ativação de c-Met aumenta a proliferação celular, migração, morfogénese, sobrevivência (incluindo proteção contra apoptose), e síntese de proteases, características que estão associadas a fenótipo celular invasivo e fracos resultados clínicos e resistência a fármacos em pacientes com cancro. A via de sinalização de c-Met é uma das vias mais frequentemente desreguladas em cancros humanos, e ocorre em praticamente todos os tipos de tumores sólidos.

A Publicação Internacional PCT WO 09/007427 divulga anticorpos de c-Met de murídeo e humanizados

enxertados com CDR. O anticorpo de murídeo 224G11 aí divulgado não se ligava ao domínio Sema de c-Met. Outras propriedades funcionais do derivado humanizado de IgG1 deste anticorpo de murídeo, designado mAb h224G11, são relatadas nos Resumos Nos. 835 (dados *in vitro*) e 2792 (dados *in vivo*) e seus pósteres acompanhantes apresentados na reunião da American Association for Cancer Research (Denver, CO) em abril de 2009. Estes resumos e pósteres divulgam que o mAb h224G11 bivalente é desprovido de propriedades agonistas intrínsecas, comporta-se como um antagonista total de c-Met, e diminui potencialmente a dimerização de c-Met. É relatado que 224G11 de murídeo subregula c-Met e bloqueia a fosforilação de c-Met *in vivo*. No caso de outros recetores, a dimerização é um pré-requisito para a internalização e degradação do recetor. Esses resumos e pósteres não divulgam quaisquer dados relativos à internalização de c-Met. Além disso, o epitopo ao qual o anticorpo humanizado se liga dentro de c-Met não está identificado.

A Publicação Internacional PCT WO 05/016382 divulga também anticorpos de c-Met, mas não identifica o ou os epitopos aos quais os anticorpos se ligam. É proporcionado um exemplo de mapeamento de epitopo, no entanto os resultados apresentados indicam apenas que seis anticorpos de c-Met se ligam a um epitopo comum enquanto um sétimo anticorpo de c-Met se liga a um epitopo distinto. Os epitopos particulares aos quais estes anticorpos de c-Met se ligam não são proporcionados.

Existe a necessidade de anticorpos antagonistas para c-Met humano, cuja ligação à cadeia α de c-Met humano facilite a internalização do recetor a partir da superfície da célula, na presença e/ou ausência de HGF. Há também a necessidade de anticorpos antagonistas para c-Met humano, cuja ligação à cadeia α de c-Met humano facilite a internalização do recetor a partir da superfície celular em células compreendendo variantes de c-Met contendo mutações de ganho de função. Há também a necessidade de anticorpos antagonistas para c-Met humano que induzam degradação de c-Met e redução de c-Met fosforilado. Tais atividades antagonistas poderiam diminuir o número de locais de ligação disponíveis para HGF na superfície de células tumorais, e terminar a ativação da via causada pela sobre-expressão, amplificação, ou mutação de c-Met. Ao mesmo tempo, tais anticorpos devem inibir a ligação de HGF a c-Met e a ativação de c-Met induzida por HGF, e induzir pouca ou nenhuma atividade agonista eles próprios.

Os compostos de anticorpos do presente invento satisfazem estas necessidades. Ligam-se a epitopos na cadeia α do domínio Sema de c-Met humano, inibindo a ligação de HGF a c-Met e a ativação do recetor, induzindo ao mesmo tempo pouca ou nenhuma atividade agonista. Os anticorpos do presente invento induzem também a internalização do recetor na presença ou ausência de HGF e também em células compreendendo variantes de c-Met contendo mutações de ganho de função. Induzem a degradação de c-Met

e induzem a redução de c-Met humano fosforilado, e inibem a proliferação dependente de HGF e independente de HGF de células tumorais que expressam este recetor. Tendo em vista estas propriedades, estes compostos de anticorpos devem ser terapêuticamente úteis no tratamento de cancros mediados por c-Met através de uma variedade de diferentes mecanismos.

Além disso, os presentes compostos de anticorpos possuem várias outras propriedades desejáveis. Exibem elevada afinidade (K_D) para c-Met, bloqueiam a fosforilação de c-Met mediada por HGF e a sinalização a jusante, a proliferação celular, e a migração celular; e induzem apenas fraca fosforilação de c-Met induzindo ao mesmo tempo pouca ou nenhuma atividade biológica agonista semelhante à de HGF tal como a indução da proliferação de células tumorais, motilidade, invasão, tubulogénese, angiogénese, ou efeitos anti-apoptóticos. Eles inibem tanto a ativação da via de c-Met dependente do ligando (HGF) como independente do ligando. Adicionalmente, os compostos de anticorpos do presente invento ligam-se de preferência ao domínio extracelular (ECD) de c-Met humano em comparação com os ECD dos recetores intimamente relacionados RON e PlexinA2, e não causam "derramamento" do ECD de c-Met.

De acordo com o presente invento, é proporcionado um anticorpo monoclonal de c-Met, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, compreendendo três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três

regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR), em que LCDR1 compreende a sequência de aminoácidos SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 53), LCDR2 compreende a sequência de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54), LCDR3 compreende a sequência de aminoácidos QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 56), HCDR1 compreende a sequência de aminoácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65), HCDR2 compreende a sequência de aminoácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 68), e HCDR3 compreende a sequência de aminoácidos ANWLDY (SEQ ID NO: 69).

De preferência, o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento liga-se a um epitopo dentro da cadeia α de c-Met humano e induz a internalização de c-Met humano da superfície celular.

De maior preferência, o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento induz internalização de c-Met humano da superfície celular independente do fator de crescimento de hepatócitos (HGF).

Ainda de preferência, o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento, liga-se dentro de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de:

- a) 121 VVDTYYDDQL $_{130}$ (SEQ ID NO: 77),
- b) 131 ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS $_{156}$ (SEQ ID NO: 78),

- c) ₁₇₉ALGAKVLSSVKDRFINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 79), e
- d) ₂₁₆VRRLKETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 80).

É preferido que o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento, se ligue dentro uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de:

- a. ₁₂₃DTYYDD₁₂₈ (SEQ ID NO: 81),
- b. ₁₄₄HVFPHNHTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 82),
- c. ₁₉₂FINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 83), e
- d. ₂₂₀KETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 84).

Ainda mais preferido é um anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento que se ligue a uma sequência de aminoácidos dentro do epitopo conformacional caracterizado por ₁₂₃DTYYDD₁₂₈ (SEQ ID NO: 81), ₁₄₄HVFPHNHTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 82), ₁₉₂FINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 83), e ₂₂₀KETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 84), inclusive.

De preferência, o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento compreende uma região variável de cadeia leve (LCVR) e uma região variável de cadeia pesada (HCVR), em que a LCVR compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 e a HCVR compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

É preferido que o anticorpo monoclonal, ou

fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento compreenda uma cadeia leve possuindo uma região constante capa e uma cadeia pesada possuindo uma região constante de cadeia pesada de IgG4.

A cadeia leve é de preferência codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 35, e a cadeia pesada é de preferência codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 47.

De preferência, o anticorpo monoclonal de acordo com o presente invento compreende duas cadeias leves codificadas pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 35 e duas cadeias pesadas codificadas pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 47.

De maior preferência, o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento, tem uma cadeia leve que é idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 35; e uma cadeia pesada que é idêntica à sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 47.

De preferência, o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento, compreende duas cadeias leves em que a sequência de aminoácidos da cadeia leve é idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência

polinucleotídica de SEQ ID NO: 35; e duas cadeias pesadas em que a sequência de aminoácidos da cadeia pesada é idêntica à sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 47.

De preferência, o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento, compreende uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e uma cadeia pesada possuindo uma região constante de cadeia pesada de IgG4.

Ainda de maior preferência, o anticorpo monoclonal de acordo com o presente invento compreende duas cadeias leves possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e duas cadeias pesadas possuindo uma região constante de cadeia pesada de IgG4.

De acordo com um segundo aspeto do presente invento, é proporcionada uma composição farmacêutica, compreendendo o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, do presente invento, e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

De acordo com um terceiro aspeto do presente invento, é proporcionado um anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, do presente invento para utilização em terapia.

De preferência, o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, do presente invento é para utilização no tratamento de cancro num humano.

De maior preferência, o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com o presente invento é para tratar cancro gástrico, do rim, do cólon, colorretal, da cabeça e do pescoço, da próstata, melanoma ou do pulmão.

Por conseguinte, o presente invento proporciona:

Um anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, que:

- a) se liga a um epitopo dentro da cadeia α de c-Met humano, e
- b) induz internalização de c-Met humano da superfície celular.

Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmento de ligação ao antigénio destes em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio deste induz internalização de c-Met humano da superfície celular independente do fator de crescimento de hepatócitos. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra

concretização, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes que induz internalização de c-Met humano em células compreendendo uma variante de c-Met humano contendo uma mutação de ganho de função. A mutação de ganho de função pode ser a mutação do domínio cinase de c-Met M149T ou a mutação do domínio justamembranar R988C.

Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio deste induz pelo menos 40% de internalização de c-Met humano da superfície celular em células. Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio deste induz pelo menos 45% de internalização de c-Met humano da superfície celular em células. Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio deste induz pelo menos 50% de internalização de c-Met humano da superfície celular em células. Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio deste

induz pelo menos 55% de internalização de c-Met humano da superfície celular em células. Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio deste induz pelo menos 60% de internalização de c-Met humano da superfície celular em células. Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio deste induz pelo menos 65% de internalização de c-Met humano em células. Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio deste induz pelo menos 70% de internalização de c-Met humano da superfície celular em células.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, o qual induz redução do c-Met total em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que induz redução do c-Met total em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que induz redução do c-Met total em células tumorais independentes do fator de crescimento de

hepatócitos compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que induz redução do c-Met fosforilado em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que se liga à cadeia α de c-Met humano substancialmente no mesmo epitopo que um anticorpo compreendendo uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 28 e uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 40, ou que se liga à cadeia α de c-Met humano substancialmente no mesmo epitopo que um anticorpo compreendendo uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 29 e uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, excluindo aqueles compreendendo uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 26 e uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 38, em que o epitopo compreende um ou mais resíduos de aminoácidos dentro de $_{144}\text{HVFPHNHTADIQS}_{156}$ (SEQ ID NO: 82) inclusive.

Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio, em que o epitopo compreende ainda um ou mais resíduos de aminoácidos dentro de ₁₂₃DTYYDD₁₂₈ (SEQ ID NO: 81) inclusive.

Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio, em que o epitopo compreende ainda um ou mais resíduos de aminoácidos dentro de ₁₉₂FINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 83) inclusive.

Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio, em que o epitopo compreende ainda um ou mais resíduos de aminoácidos dentro de ₂₂₀KETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 84) inclusive.

Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, em que o anticorpo se liga dentro de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em:

- a) ₁₂₁VVDTYYDDQL₁₃₀ (SEQ ID NO: 77),
- b) ₁₃₁ISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 78),
- c) ₁₇₉ALGAKVLSSVKDRFINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 79), e
- d) ₂₁₆VRRLKETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 80), inclusive.

Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, em que o anticorpo se liga dentro de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em:

- a) ₁₂₃DTYYDD₁₂₈ (SEQ ID NO: 81),
- b) ₁₄₄HVFPHNHTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 82),
- c) ₁₉₂FINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 83), e
- d) ₂₂₀KETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 84), inclusive.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antígeno destes que se liga a uma sequência de aminoácidos dentro do epitopo caracterizado por ₁₂₁VVDTYYDDQL₁₄₀ (SEQ ID NO: 77), ₁₃₁ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 78), ₁₇₉ALGAKVLSSVKDRFINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 79), e ₂₁₆VRRLKETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 80), inclusive.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antígeno destes que se liga a uma sequência de aminoácidos dentro do epitopo caracterizado por ₁₂₃DTYYDD₁₂₈ (SEQ ID NO: 81), ₁₄₄HVFPHNHTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 82), ₁₉₂FINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 83), e ₂₂₀KETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 84) inclusive.

Qualquer um dos anticorpos anteriores ou fragmentos de ligação ao antígeno destes, em que o anticorpo se liga dentro de uma sequência de aminoácidos de ₉₅CFPCQDCSSKA₁₀₅ (SEQ ID NO: 86) inclusive.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antígeno destes, excluindo aqueles que compreendem uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 29 e uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos mostrada

em SEQ ID NO: 41, em que o epitopo compreende um ou mais resíduos de aminoácidos dentro de ${}_{95}\text{CFPCQDCSSKA}_{105}$ (SEQ ID NO: 86) inclusive.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores, ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que se liga a c-Met humano, que compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR),

em que as referidas três LCDR e as referidas três HCDR são selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) LCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49);

LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos $\text{GTSX}_1\text{LX}_2\text{S}$ (SEQ ID NO: 87), em que X_1 é Y ou R, e X_2 é A ou R;

LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos QQWSSYPYS (SEQ ID NO: 51);

HCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59);

HCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos $\text{WIYPVTGDTYYX}_7\text{EX}_8\text{FKG}$ (SEQ ID NO: 90), em que X_7 é N, I, ou R, e X_8 é K ou P; e

HCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos GYGAFX_9Y (SEQ ID NO: 91), em que X_9 é Y ou F; e

b) LCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos $\text{SVSSSVX}_3\text{SIYLNH}$ (SEQ ID NO: 88), em que X_3 é S ou R;

LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos X₄X₅YX₆GYPLT (SEQ ID NO: 89), em que X₄ é I ou Q, X₅ é Q ou V, e X₆ é S ou R;

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos RVNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEG (SEQ ID NO: 92), em que X₁₀ é N ou Y, X₁₁ é G ou R, e X₁₂ é G ou S; e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos X₁₃NX₁₄LDY (SEQ ID NO: 93), em que X₁₃ é T ou A, e X₁₄ é W ou I;

em que o referido anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste se liga a um epitopo dentro da cadeia α do referido c-Met humano e induz internalização de c-Met humano da superfície celular.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores, ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que se liga a c-Met humano, que compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR), em que o anticorpo compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (LCDR), em que

LCDR1 compreende a sequência de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49);

LCDR2 compreende a sequência de aminoácidos GTSX₁LX₂S (SEQ ID NO: 87), em que X₁ é Y ou R, e X₂ é A ou R;

LCDR3 compreende a sequência de aminoácidos QQWSSYPYS (SEQ ID NO: 51);

HCDR1 compreende a sequência de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59);

HCDR2 compreende a sequência de aminoácidos WIYPVTGDTYYX₇EX₈FKG (SEQ ID NO: 90), em que X₇ é N, I, ou R, e X₈ é K ou P; e

HCDR3 compreende a sequência de aminoácidos GYGAFX₉Y (SEQ ID NO: 91), em que X₉ é Y ou F.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores, ou fragmentos de ligação ao antígeno destes, que se liga a c-Met humano, que compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (LCDR), em que

LCDR1 compreende a sequência de aminoácidos SVSSSVX₃SIYLH (SEQ ID NO: 88); em que X₃ é S ou R;

LCDR2 compreende a sequência de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreende a sequência de aminoácidos X₄X₅YX₆GYPLT (SEQ ID NO: 89), em que X₄ é I ou Q, X₅ é Q ou V, e X₆ é S ou R;

HCDR1 compreende a sequência de aminoácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR2 compreende a sequência de aminoácidos RVNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEG (SEQ ID NO: 92), em que X₁₀ é N ou Y, X₁₁ é G ou R, e X₁₂ é G ou S; e

HCDR3 compreende a sequência de aminoácidos X₁₃NX₁₄LDY (SEQ ID NO: 93), em que X₁₃ é T ou A, e X₁₄ é W ou I.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores, ou fragmentos de ligação ao antígeno destes, que se liga a c-Met humano, que compreende três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR), e

em que as referidas três LCDR e as referidas três HCDR são selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) LCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49);

LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos GTSYLAS (SEQ ID NO: 50);

LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos QWSSYPYS (SEQ ID NO: 51);

HCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59);

HCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos WIYPVTGDTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 60); e

HCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos GYGAFYY (SEQ ID NO: 61);

b) LCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49);

LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos GTSYLAS (SEQ ID NO: 50);

LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos QWSSYPYS (SEQ ID NO: 51);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos WIYPVTGDTYYIEKFKG (SEQ ID NO: 62); e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYGAFY (SEQ ID NO: 63);

c) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos GTSRLRS (SEQ ID NO: 52);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos QQWSSYPYS (SEQ ID NO: 51);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos WIYPVTGDTYYREPFKG (SEQ ID NO: 64), e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYGAFY (SEQ ID NO: 61);

d) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 53);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos IQYSGYPLT (SEQ ID NO: 55);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos RVNPNRGGTTYNQKFEK (SEQ ID NO: 66), e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos TNWLDY (SEQ ID NO: 67);

e) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 53);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 56);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR12 compreendendo a sequência de amino-ácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 68); e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos ANWLDY (SEQ ID NO: 69); e

f) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSSVRSIYLH (SEQ ID NO: 57);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos QVYRGYPLT (SEQ ID NO: 58);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 70); e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos ANILDY (SEQ ID NO: 71); e

em que o referido anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste se liga a um epitopo dentro da cadeia α do referido c-Met humano e induz internalização de c-Met humano da superfície celular.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes compreendendo três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (LCDR), em que as referidas três LCDR e as referidas três HCDR são selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos GTSYLAS (SEQ ID NO: 50);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos QQWSSYPYS (SEQ ID NO: 51);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos WIYPVTGDTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 60); e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYGAFYY (SEQ ID NO: 61);

b) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos GTSYLAS (SEQ ID NO: 50);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos QQWSSYPYS (SEQ ID NO: 51);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos WIYPVTGDTYYIEKFKG (SEQ ID NO: 62); e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYGAFYY (SEQ ID NO: 63);

c) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSS1SSTNLH (SEQ ID NO: 49);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos GTSRLRS (SEQ ID NO: 52);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos QQWSSYPYS (SEQ ID NO: 51);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos WIYPVTGDTYYREPFKG (SEQ ID NO: 64); e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYGAFYY (SEQ ID NO: 61).

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes compreendendo três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR), em que as referidas três LCDR e as referidas três HCDR são selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSSVSSIYLLH (SEQ ID NO: 53);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos IQYSGYPLT (SEQ ID NO: 55);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos RVNPNRGGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 66); e

CDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos TNWLDY (SEQ ID NO: 67);

b) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 53);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 56);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos RVNPNRRGGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 68); e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos ANWLDY (SEQ ID NO: 69); e

c) LCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos SVSSSVRSIYLH (SEQ ID NO: 57);

LCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos QVYRGYPLT (SEQ ID NO: 58);

HCDR1 compreendendo a sequência de amino-ácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR2 compreendendo a sequência de amino-ácidos RVNPNRRGGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 70); e

HCDR3 compreendendo a sequência de amino-ácidos ANILDY (SEQ ID NO: 71).

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores, ou fragmentos de ligação ao antigénio destes compreendendo três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR), em que:

LCDR1 compreende a sequência de aminoácidos SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 53);

LCDR2 compreende a sequência de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreende a sequência de aminoácidos IQYSGYPLT (SEQ ID NO: 55);

HCDR1 compreende a sequência de aminoácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR2 compreende a sequência de aminoácidos RVNPNRGGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 66); e

HCDR3 compreende a sequência de aminoácidos TNWLDY (SEQ ID NO: 67).

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores, ou fragmentos de ligação ao antigénio destes compreendendo três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR), em que:

LCDR1 compreende a sequência de aminoácidos SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 53);

LCDR2 compreende a sequência de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54);

LCDR3 compreende a sequência de aminoácidos QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 56);

HCDR1 compreende a sequência de aminoácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65);

HCDR12 compreende a sequência de aminoácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 68); e

HCDR3 compreende a sequência de aminoácidos ANWLDY (SEQ ID NO: 69).

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores, ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, compreendendo uma região variável de cadeia leve (LCVR) e uma região variável de cadeia pesada (HCVR), em que a referida LCVR e a referida HCVR, respetivamente, compreendem sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) SEQ ID NO: 94 e SEQ ID NO: 96; e

b) SEQ ID NO: 95 e SEQ ID NO: 97,

em que o referido anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste se liga a um epitopo dentro da cadeia α do referido c-Met humano e induz internalização de c-Met humano da superfície celular.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores, ou fragmentos de ligação ao antigénio destes compreendendo uma região variável de cadeia leve (LCVR) e uma região variável de cadeia pesada (HCVR), em que a referida LCVR compreende SEQ ID NO: 94 e a referida HCVR compreende SEQ ID NO: 96.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores

res, ou fragmentos de ligação ao antigénio destes compreendendo uma região variável de cadeia leve (LCVR) e uma região variável de cadeia pesada (HCVR), em que a referida LCVR compreende SEQ ID NO: 95 e a referida HCVR compreende SEQ ID NO: 97.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, em que a referida LCVR e a referida HCVR compreende sequências de aminoácidos que são selecionadas a partir do grupo que consiste em:

- a) LCVR é SEQ ID NO: 1 e HCVR é SEQ ID NO: 13;
- b) LCVR é SEQ ID NO: 2 e HCVR é SEQ ID NO: 14;
- c) LCVR é SEQ ID NO: 3 e HCVR é SEQ ID NO: 15;
- d) LCVR é SEQ ID NO: 4 e HCVR é SEQ ID NO: 16;
- e) LCVR é SEQ ID NO: 5 e HCVR é SEQ ID NO: 17;

e

- f) LCVR é SEQ ID NO: 6 e LCVR é SEQ ID NO: 18.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, em que a referida LCVR e a referida HCVR, respetivamente, compreendem sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em:

- a) LCVR é SEQ ID NO: 1 e HCVR é SEQ ID NO: 13;
- b) LCVR é SEQ ID NO: 2 e HCVR é SEQ ID NO: 14;

e

- c) LCVR é SEQ ID NO: 3 e HCVR é SEQ ID NO: 15.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, em que a referida LCVR e a referida HCVR, respetivamente, compreendem sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em:

- a) LCVR é SEQ ID NO: 4 e HCVR é SEQ ID NO: 16;
 - b) LCVR é SEQ ID NO: 5 e HCVR é SEQ ID NO: 17;
- e
- c) LCVR é SEQ ID NO: 6 e HCVR é SEQ ID NO: 18.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, em que a referida LCVR compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 e a referida HCVR compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, em que a referida LCVR compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 e a referida HCVR compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores em que o referido anticorpo compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada em que a cadeia leve e a cadeia pesada compreendem sequências de aminoácidos que são selecionadas a partir do grupo que consiste em:

- a) cadeia leve é SEQ ID NO: 25 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 37;

b) cadeia leve é SEQ ID NO: 26 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 38;

c) cadeia leve é SEQ ID NO: 27 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 39;

d) cadeia leve é SEQ ID NO: 28 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 40;

e) cadeia leve é SEQ ID NO: 29 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 41; e

f) cadeia leve é SEQ ID NO: 30 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 42.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores em que o referido anticorpo compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada em que a cadeia leve e a cadeia pesada compreendem sequências de aminoácidos que são selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) cadeia leve é SEQ ID NO: 25 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 37;

b) cadeia leve é SEQ ID NO: 26 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 38; e

c) cadeia leve é SEQ ID NO: 27 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 39.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores em que o referido anticorpo compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada em que a cadeia leve e a cadeia pesada compreendem sequências de aminoácidos que são selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) cadeia leve é SEQ ID NO: 28 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 40;

b) cadeia leve é SEQ ID NO: 29 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 41; e

c) cadeia leve é SEQ ID NO: 30 e cadeia pesada é SEQ ID NO: 42.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores em que a referida cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a referida cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores em que a referida cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a referida cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores em que o referido anticorpo compreende duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, em que cada cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e cada cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores em que o referido anticorpo compreende duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, em que cada cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e cada cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que compete com qualquer um dos anticorpos monoclonais de c-Met anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes para ligação a c-Met. Tal anticorpo monoclonal de competição ou fragmento de ligação ao antigénio deste pode ligar-se ao mesmo epitopo de c-Met como qualquer um dos anticorpos monoclonais de c-Met anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste compete com um anticorpo que compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste compete com um anticorpo que compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que induz redução do c-Met humano total e c-Met humano fosforilado em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos que sobre-expressam constitutivamente o referido c-Met humano. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio

deste que induz redução do c-Met humano total e c-Met humano fosforilado em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos que sobre-expressam constitutivamente o referido c-Met humano, compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que induz redução do c-Met humano total e c-Met humano fosforilado em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos que sobre-expressam constitutivamente o referido c-Met humano, compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que induz redução do c-Met humano total e c-Met humano fosforilado em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos que fosforilam constitutivamente o referido c-Met humano. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que induz redução do c-Met humano total e c-Met humano fosforilado em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos que fosforilam constitutivamente o referido c-Met humano, compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência

de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que induz redução do c-Met humano total e c-Met humano fosforilado em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos que fosforilam constitutivamente o referido c-Met humano, compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que induz redução do c-Met humano total e c-Met humano fosforilado em células tumorais independentes do fator de crescimento de hepatócitos que respondem ao fator de crescimento de hepatócitos.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que se ligam de preferência ao domínio extracelular de c-Met humano em comparação com o domínio extracelular de RON humano ou o domínio extracelular de PlexinA2 humano.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que não induz derramamento do domínio extracelular de c-Met humano. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmen-

to de ligação ao antigénio deste que não induz derramamento do domínio extracelular de c-Met humano, compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que não induz derramamento do domínio extracelular de c-Met humano, compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que não protege células tumorais expressando c-Met humano de apoptose induzida por estaurosporina. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que não protege células tumorais expressando c-Met humano de apoptose induzida por estaurosporina, compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que não protege células tumorais expressando c-Met humano de apoptose induzida por estaurosporina, compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que inibe a proliferação dependente do fator de crescimento de hepatócitos e independente do fator de crescimento de hepatócitos de células tumorais que expressam c-Met humano.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, que inibe a ligação do fator de crescimento de hepatócitos humano a c-Met humano.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes que não induz atividades biológicas agonistas semelhantes a HGF. Atividades biológicas agonistas semelhantes a HGF incluem proliferação de células tumorais, motilidade de células tumorais, invasão de células tumorais, tubulogénese, angiogénese, e efeitos anti-apoptóticos. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste que não induz atividades biológicas agonistas semelhantes a HGF, compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Uma composição farmacêutica compreendendo qual-

quer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes, e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes para utilização em terapia. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste para utilização em terapia compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra concretização, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste para utilização em terapia compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes para utilização em tratamento de um cancro num humano. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste para utilização em tratamento de um cancro num humano compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou

fragmento de ligação ao antigénio deste para utilização em tratamento de um cancro num humano compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes para utilização em tratamento de um cancro num humano em combinação com outro agente terapêutico. Numa concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste para utilização em tratamento de um cancro num humano em combinação com outro agente terapêutico compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Noutra concretização preferida, o anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antigénio deste para utilização em tratamento de um cancro num humano em combinação com outro agente terapêutico compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada, em que a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Uma composição farmacêutica compreendendo qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

Utilização de qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes para o fabrico de um medicamento para tratamento de um cancro num humano.

Um método de tratamento de um cancro, compreendendo a administração a um paciente humano a necessitar desta de uma quantidade eficaz de qualquer um dos anticorpos monoclonais anteriores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes.

Definições

Um anticorpo inteiro tal como existe na natureza é uma molécula de imunoglobulina compreendendo 2 cadeias pesadas (H) e 2 cadeias leves (L) interligadas por ligações dissulfureto. A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100-110 ou mais aminoácidos primeiramente responsáveis pelo reconhecimento do antigénio através das regiões determinantes de complementaridade (CDR) nela contidas. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante primariamente responsável pela função efetora.

As CDR são intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais ("FR"). Cada região variável de cadeia leve (LCVR) e região variável de cadeia pesada (HCVR) é composta por 3 CDR e 4 FR, dispostas

do terminal amino para o terminal carboxilo na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As 3 CDR da cadeia leve são referidas como "LCDR1, LCDR2, e LCDR3" e as 3 CDR da cadeia pesada são referidas como "HCDR1, HCDR2, e HCDR3". As CDR contêm a maior parte dos resíduos que formam interações específicas com o antigénio. A numeração e o posicionamento dos resíduos de aminoácidos das CDR dentro das regiões LCVR e HCVR estão de acordo com a convenção de numeração de Kabat bem conhecida.

As cadeias leves são classificadas como capa ou lambda, e são caracterizadas por uma região constante particular tal como é conhecido na técnica. As cadeias pesadas são classificadas como gama, miu, alfa, delta, ou épsilon, e define o isotipo de um anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD, ou IgE, respetivamente. Os anticorpos IgG podem ainda ser divididos em subclasses, e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Cada tipo de cadeia pesada é caracterizado por uma região constante particular com uma sequência bem conhecida na técnica.

Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo monoclonal" (mAb) aplicado aos presentes compostos anticorpo refere-se a um anticorpo que é derivado de uma única cópia ou clone incluindo, por exemplo, qualquer clone eucariótico, procariótico, ou fágico, e não o método através do qual é produzido. Os mAb do presente invento existem de preferência numa população homogénea ou substancialmente homogénea. Os mAb completos contêm 2 cadeias pesadas e 2

cadeias leves. "Fragmentos de ligação ao antigénio" de tais anticorpos monoclonais incluem, por exemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv de cadeia simples, e anticorpos de um braço compreendendo uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Os anticorpos monoclonais e fragmentos de ligação ao antigénio destes do presente invento podem ser produzidos, por exemplo, através de tecnologias recombinantes, tecnologias de apresentação fágica, tecnologias sintéticas, e.g., enxerto de CDR, ou combinações de tais tecnologias, ou outras tecnologias conhecidas na técnica.

"Compostos de anticorpos" referem-se a mAb e Fab aqui divulgados. Compostos de anticorpos adicionais exibindo propriedades funcionais semelhantes de acordo com o presente invento podem ser gerados através de métodos convencionais. Por exemplo, podem ser imunizados ratinhos com c-Met humano ou fragmentos deste, os anticorpos resultantes podem ser recuperados e purificados, e a determinação de se possuem propriedades de ligação e funcionais semelhantes a ou iguais às dos compostos de anticorpos aqui divulgados pode ser avaliada através dos métodos divulgados nos Exemplos 2-19, abaixo. Fragmentos de ligação ao antigénio podem também ser preparados através de métodos convencionais. Os métodos para produção e purificação de anticorpos e fragmentos de ligação ao antigénio são bem conhecidos na técnica e podem ser verificados, por exemplo, em Harlow e Lane (1988) "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, Nova Iorque, capítulos 5-8 e 15, ISBN 0-87969-314-2.

A frase "anticorpos humanos modificados" refere-se a anticorpos monoclonais e fragmentos de ligação ao antigénio para além dos compostos de anticorpos aqui divulgados que possuem propriedades de ligação e funcionais de acordo com o invento semelhantes àquelas aqui divulgadas, e que possuem regiões estruturais que são substancialmente humanas ou totalmente humanas envolvendo CDR derivadas de um anticorpo não humano. "Região estrutural" ou "sequência estrutural" refere-se a qualquer uma das regiões estruturais 1 a 4. Os anticorpos humanos modificados e fragmentos de ligação ao antigénio englobados pelo presente invento incluem moléculas em que qualquer uma ou mais das regiões estruturais 1 a 4 é substancialmente ou totalmente humana, *i.e.*, em que está presente qualquer uma das possíveis combinações individuais de regiões estruturais substancialmente ou totalmente humanas 1 a 4. Por exemplo, isto inclui moléculas em que a região estrutural 1 e a região estrutural 2, região estrutural 1 e região estrutural 3, região estrutural 1, 2, e 3, etc., são substancialmente ou totalmente humanas. Estruturas substancialmente humanas são aquelas que têm pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com uma sequência estrutural da linha germinativa humana conhecida. De preferência, as estruturas substancialmente humanas têm pelo menos cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, ou cerca de 99% de identidade de sequência com uma sequência estrutural da linha germinativa humana conhecida.

Estruturas totalmente humanas são as que são idênticas a uma sequência estrutural da linha germinativa humana conhecida. Sequências estruturais da linha germinativa humana podem ser obtidas a partir de ImMunoGeneTics (IMGT) através do seu sítio da internet <http://imgt.cines.fr>, ou a partir de *The Immunoglobulin FactsBook* de Marie-Paule Lefranc e Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Por exemplo, estruturas da cadeia leve da linha germinativa podem ser selecionadas a partir do grupo que consiste em: A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, LI, L1I, L12, L2, L5, L15, L6, L8, O12, O2, e O8, e regiões estruturais de cadeia pesada da linha germinativa podem ser selecionadas a partir do grupo que consiste em: VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VHI-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VHI-18, VHI-69, V1-13-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59, e VH5-5I.

Anticorpos humanos modificados para além daqueles aqui divulgados exibindo propriedades funcionais semelhantes de acordo com o presente invento podem ser gerados utilizando vários métodos diferentes. Numa abordagem, as CDR do composto de anticorpo original são enxertadas numa estrutura humana que tem uma elevada identidade de sequência com a estrutura do composto do anticorpo original. A identidade de sequência da nova estrutura será em geral de pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos

cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 99% idêntica à sequência da estrutura correspondente no composto de anticorpo original. No caso de estruturas possuindo menos de 100 resíduos de aminoácidos, um, dois, ou três resíduos de aminoácidos podem ser mudados. Este enxerto pode resultar numa redução na afinidade de ligação em comparação com a do anticorpo original. Se for este o caso, a estrutura pode ser retro-mutada para a estrutura original em certas posições com base em critérios específicos divulgados por Queen *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2869. Referências adicionais descrevendo métodos úteis para humanizar anticorpos de ratinho incluem as Patentes U.S. Nos. 4816397; 5225539, e 5693761; programas de computador ABMOD e ENCAD tal como descrito em Levitt (1983) *J. Mol. Biol.* 168: 595-620; e o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-327; e Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239: 1534-1536.

A identificação de resíduos para considerar a retro-mutação pode ser realizada como se segue.

Quando um aminoácido recai sob a seguinte categoria, o aminoácido estrutural da sequência da linha germinativa humana que está a ser utilizada (a "estrutura aceitadora") é substituído por um aminoácido estrutural de uma estrutura do composto do anticorpo original (a "estrutura dadora"):

- a) o aminoácido na região estrutural humana da

estrutura aceitadora é invulgar para estruturas humanas nessa posição, enquanto o aminoácido correspondente na imunoglobulina dadora é típico para estruturas humanas nessa posição;

b) a posição do aminoácido é imediatamente adjacente a uma das CDR; ou

c) qualquer átomo da cadeia lateral de um aminoácido estrutural está dentro de cerca de 5-6 angströms (de centro a centro) de qualquer átomo de um aminoácido de CDR num modelo tridimensional de imunoglobulina.

Quando cada um dos aminoácidos na região estrutural humana da estrutura aceitadora e um aminoácido correspondente na estrutura dadora é geralmente invulgar para estruturas humanas nessa posição, tal aminoácido pode ser substituído por um aminoácido típico para estruturas humanas nessa posição. Este critério de retro-mutação permite recuperar a atividade do composto de anticorpo original.

Outra abordagem para a criação de anticorpos humanos modificados exibindo propriedades funcionais semelhantes às dos compostos de anticorpos aqui divulgados envolve mutação aleatória de aminoácidos dentro das CDR enxertadas sem alterar a estrutura, e pesquisa das moléculas resultantes para afinidade de ligação e outras propriedades funcionais que sejam tão boas ou melhores que as dos compostos de anticorpos originais. Mutações individuais podem também ser introduzidas em cada uma das

posições de aminoácidos dentro de cada CDR, seguido por avaliação dos efeitos de tais mutações na afinidade de ligação e outras propriedades funcionais. Mutações individuais que produzam propriedades melhoradas podem ser combinadas para avaliar os seus efeitos na combinação de umas com as outras.

Além disso, é possível uma combinação de ambas as abordagens anteriores. Depois do enxerto de CDR, pode retro-mutar-se regiões estruturais específicas para além de introduzir alterações de aminoácidos nas CDR. Esta metodologia é descrita em Wu *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 294: 151-162.

Aplicando os ensinamentos do presente invento, um perito na especialidade pode utilizar técnicas comuns, *e.g.*, mutagénese dirigida ao local, para substituir aminoácidos dentro da CDR e sequências estruturais presentemente divulgadas e assim gerar mais sequências de aminoácidos de regiões variáveis derivadas das presentes sequências. Podem ser introduzidos até todos os aminoácidos de ocorrência natural num local de substituição específico. Os métodos aqui divulgados podem ser utilizados para pesquisar estas sequências de aminoácidos da região variável adicionais para identificar sequências possuindo as funções *in vivo* indicadas. Deste modo, podem ser identificadas outras sequências adequadas para a preparação de anticorpos humanos modificados e porções de ligação ao antigénio destes de acordo com o presente invento. De

preferência, a substituição de aminoácidos dentro das estruturas está restringida a uma, duas, ou três posições dentro de qualquer uma ou mais das 4 regiões estruturais de cadeia leve e/ou cadeia pesada aqui divulgadas. De preferência, a substituição de aminoácidos dentro das CDR está restringida a uma, duas, ou três posições dentro qualquer uma ou mais das 3 CDR de cadeia leve e/ou cadeia pesada. Combinações das várias alterações dentro destas regiões estruturais e CDR descritas acima são também possíveis.

Que as propriedades funcionais dos compostos de anticorpos geradas através da introdução das modificações de aminoácidos discutidas acima estão em conformidade com as exibidas pelas moléculas específicas aqui divulgadas pode ser confirmado através dos métodos divulgados abaixo nos Exemplos 2-19.

O termo "epitopo" refere-se a um arranjo específico de aminoácidos localizado num péptido ou numa proteína ao qual um anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga. Os epitopos consistem frequentemente num agrupamento de superfície quimicamente ativa de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcares, e têm características da estrutura tridimensional específicas bem como características de carga específicas. Os epitopos podem ser lineares, ou seja, envolvendo a ligação a uma única sequência de aminoácidos, ou conformacionais, *i.e.*, envolvendo a ligação a duas ou mais sequências de

aminoácidos em várias regiões do antígeno que podem não ser necessariamente contíguas. Os epitopos aqui divulgados podem consistir em, consistir essencialmente em, ou compreender as sequências de aminoácidos divulgadas no Exemplo 3.

Os anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação ao antígeno destes que "competem" com as moléculas aqui divulgadas são os que se ligam a c-Met humano no ou nos locais que são idênticos a, ou se sobrepõem ao ou aos locais nos quais as presentes moléculas se ligam. Os anticorpos monoclonais de competição ou fragmentos de ligação ao antígeno destes podem ser identificados, por exemplo, através de um ensaio de competição de anticorpos. Por exemplo, uma amostra de c-Met humano purificado ou parcialmente purificado pode ligar-se a um suporte sólido. Depois, é adicionado um composto de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste do presente invento e um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antígeno deste suspeito de ser capaz de competir com tal composto de anticorpo do invento. Uma das duas moléculas é marcada. Se o composto marcado e o composto não marcado se ligarem a locais separados e discretos em c-Met, o composto marcado ligar-se-á ao mesmo nível esteja ou não presente o composto suspeito de competir. No entanto, se os locais de interação forem idênticos ou sobreponíveis, o composto não marcado competirá, e a quantidade de composto marcado ligado ao antígeno será reduzida. Se o composto não marcado estiver presente em excesso, ligar-se-á muito pouco, se algum,

composto marcado. Para fins do presente invento, os anticorpos monoclonais competidores ou fragmentos de ligação ao antigénio destes são os que diminuem a ligação dos presentes compostos de anticorpos a c-Met em cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, ou cerca de 99%. Detalhes dos processos para realização de tais ensaios de competição são bem conhecidos na técnica e podem ser verificados, por exemplo, em Harlow e Lane (1988) "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, páginas 567-569, ISBN 0-87969-314-2. Tais ensaios podem ser tornados quantitativos através da utilização de anticorpos purificados. Uma curva padrão é estabelecida através da titulação de um anticorpo contra si mesmo, isto é, o mesmo anticorpo é utilizado tanto para marcador como competidor. A capacidade de um anticorpo monoclonal competidor não marcado ou fragmento de ligação ao antigénio deste para inibir a ligação da molécula marcada à placa é titulada. Os resultados são traçados e as concentrações necessárias para alcançar o grau desejado de inibição da ligação são comparadas. Se os anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação ao antigénio destes que competem com os compostos de anticorpo do presente invento em tais ensaios de competição têm propriedades funcionais iguais ou semelhantes às dos presentes compostos de anticorpo, pode ser determinado através dos métodos divulgados nos Exemplos 2-19 aqui.

Os anticorpos monoclonais ou fragmentos de

ligação ao antigénio destes que se ligam substancialmente ao mesmo ou aos mesmos epitopos de c-Met que os anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação ao antigénio aqui divulgados são aqueles que se ligam a c-Met humano no ou nos locais que são sobreponíveis ao ou aos locais aos quais as presentes moléculas se ligam. Os métodos que facilitam a identificação de anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação ao antigénio destes que se ligam substancialmente ao mesmo epitopo de c-Met que os anticorpos monoclonais de c-Met ou fragmentos de ligação ao antigénio aqui divulgados são bem conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, na Publicação Internacional PCT WO 00/64946. Se tais anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação ao antigénio destes que se ligam substancialmente ao ou aos mesmos epitopos de c-Met que aqueles aqui divulgados possuem propriedades funcionais iguais ou semelhantes às dos presentes compostos de anticorpo, pode ser determinado através dos métodos divulgados nos Exemplos 2-19 aqui.

"c-Met" ou "c-Met humano" refere-se a qualquer c-Met humano, bem como a formas mutadas funcionalmente ativas deste. A estrutura do c-Met é representada esquematicamente como:



SEMA: Domínio Sema

PSI: Domínio de Plexina, Semaforinas, e Integrinas

IPT: 4 Domínios de Imunoglobulinas, Plexinas, e Fator de Transcrição

TM: Região transmembranar

JM: Domínio justamembranar

KD: Domínio cinase

No ECD de c-Met humano (SEQ ID NO: 75), os aminoácidos 1-24 compreendem a sequência sinal. A proteína madura começa no aminoácido 25 (E). O domínio Sema consiste em aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos no terminal N de c-Met, e contém a cadeia α (resíduos de aminoácidos 25-307) e parte da cadeia β (resíduos de aminoácidos 308-519).

O termo "inibe" significa a capacidade de substancialmente antagonizar, proibir, impedir, restringir, atrasar, interromper, eliminar, parar, reduzir ou inverter os efeitos biológicos de c-Met.

O termo "tratar" (ou "tratamento") significa atraso, interrupção, paragem, controlo, termo, redução, ou inversão do progresso ou da gravidade de um sintoma, um distúrbio, uma condição ou uma doença, mas não envolve necessariamente uma eliminação total de todos os sintomas, condições ou distúrbios relacionados com doença.

Eventos agudos e condições crónicas podem ser

tratados. Num evento agudo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio deste é administrado no início de um sintoma, um distúrbio, uma condição ou uma doença, e é descontinuado quando o evento agudo termina. Em contraste, um sintoma, uma desordem, uma condição ou uma doença crónico é tratado ao longo de um período de tempo mais prolongado.

O termo "quantidade eficaz" refere-se à quantidade ou dose de um composto de anticorpo do presente invento que, após administração de uma ou de múltiplas doses a um paciente, proporciona o tratamento ou a prevenção desejados. Quantidades terapeuticamente eficazes dos presentes compostos de anticorpos podem compreender uma quantidade no intervalo de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg por dose única. Uma quantidade terapeuticamente eficaz para qualquer paciente individual pode ser determinada pelo prestador de cuidados de saúde através da monitorização do efeito dos compostos de anticorpos num biomarcador, tal como um c-Met da superfície celular em tecidos tumorais ou não tumorais, regressão tumoral, etc. A análise dos dados obtidos através destes métodos permite a modificação do regime de tratamento durante a terapia de modo a que as quantidades ótimas dos compostos de anticorpos, empregues isoladamente ou em combinação com um outro agente terapêutico, sejam administradas, e de modo a que a duração do tratamento possa também ser determinada. Desta forma, o regime de dosagem/tratamento pode ser modificado ao longo do curso da terapia de modo a que sejam

administradas menores quantidades de compostos de anticorpos utilizados sozinhos ou em combinação que exibam eficácia satisfatória na redução de tumor, e de modo a que a administração de tais compostos seja continuada apenas o tempo necessário para tratar com sucesso o paciente.

Os compostos de anticorpos do presente invento podem ser utilizados como medicamentos em medicina humana, administrados através de uma variedade de vias. De maior preferência, tais composições são para administração parentérica. Tais composições farmacêuticas podem ser preparadas através de métodos bem conhecidos na técnica. Ver, *e.g.*, Remington: "The Science and Practice of Pharmacy", 19^a ed. (1995), A. Gennaro *et al.*, Mack Publishing Co., e compreendem um ou mais dos compostos de anticorpos aqui divulgados, e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

O termo "tumor" refere-se a todo o crescimento e proliferação de células neoplásicas, malignas ou benignas, e a todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos. Os termos "cancro", "canceroso" e "tumor" não são mutuamente exclusivos tal como aqui utilizados.

Os termos "cancro" e "canceroso" referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento/proliferação celular aberrante. Exemplos de cancros incluem, mas não estão limitados a, carcinomas, linfomas, blastomas, sarcomas e leucemias.

c-Met e Cancro

As vias desreguladas de c-Met podem ser induzidas através de sobrerregulação da transcrição, amplificação do gene de c-Met, alterações genéticas específicas, ou mecanismos autócrinos ou parácrinos dependentes do ligando. A causa mais frequente de ativação constitutiva de c-Met em tumores humanos é o aumento da expressão da proteína como consequência da sobrerregulação da transcrição, na ausência de amplificação génica. Além disso, a amplificação do gene *MET*, com a consequente sobre-expressão proteica e ativação constitutiva da cinase, foi relatada em vários tumores primários humanos, incluindo carcinomas gástricos e esofágicos, carcinomas do pulmão de células não pequenas (NSCL) e meduloblastomas. Tumores de origem mesenquimatosos, tais como osteossarcomas e rhabdomiossarcomas, utilizam frequentemente mecanismos autócrinos através da produção de HGF. Níveis elevados de HGF e sobre-expressão de c-Met estão frequentemente associados a fracos resultados clínicos que incluem doença mais agressiva, aumento da metástase tumoral e sobrevida encurtada do paciente. Além disso, níveis elevados de HGF e/ou proteínas c-Met em tumores conferem resistência à quimioterapia e radioterapia. Além da expressão anormal de HGF e c-Met, a via de c-Met pode ser ativada através de alterações genéticas tais como mutações de c-Met, amplificação génica, e rearranjo de genes. Mutações missense ("sem sentido") de *c-MET* são verificadas em todos os indivíduos com carcinomas renais

papilares (PRCC) hereditários bem caracterizados e num pequeno subconjunto (13%) de amostras de PRCC esporádico. Algumas das mutações possuem potencial oncogénico devido ao aumento da atividade da cinase. Trissomia do cromossoma 7, no qual ambos os genes *HGF* e *c-MET* residem, ocorre frequentemente em PRCC, e resulta numa duplicação não aleatória do alelo mutante de *c-MET*. Além disso, foram identificadas mutações somáticas de *c-MET* noutros cancros humanos, incluindo cancros gástricos, da cabeça e do pescoço, do fígado, do ovário, do pulmão de células não pequenas e da tiroide, bem como em metástases de alguns destes cancros. Ao contrário de PRCC, onde as mutações estão tipicamente confinadas ao domínio cinase, estas mutações estão frequentemente localizadas noutras regiões do recetor, por exemplo, no domínio justamembranar. Além da mutação, o gene *c-MET* é frequentemente amplificado em cancros da mama, do fígado, do cérebro, colorrectal, gástrico, do pulmão e do estômago, que é correlacionado com a progressão da doença nalguns pacientes.

Indicações terapêuticas

Sinalização de HGF/c-MET aberrante foi documentada numa ampla variedade de malignidades humanas, incluindo cancros da bexiga, da mama, cervical, colorretal, do endométrio, esofágico, gástrico, da cabeça e do pescoço, do rim, do fígado, do pulmão, nasofaríngeo, do ovário, pancreático, da próstata e da tiroide, bem como colangiocarcinoma, osteossarcoma, rabdomyosarcoma, sarcoma sino-

vial, sarcoma de Kaposi, leiomiossarcomas, e MFH/fibrosarcoma. Além disso, a expressão anormal de HGF e/ou c-Met foi também relatada em malignidades hematológicas tais como leucemia mielogénica aguda, leucemia de células T do adulto, leucemia mieloide crónica, linfomas e mieloma múltiplo, bem como outros tumores tais como melanoma, mesotelioma, tumor de Wilms, glioblastomas, e astrocitomas (resumidos em Liu *et al.* (2008) *Expert. Opin. Investig. Drugs* 17(7): 997-1011). Os anticorpos de c-Met do presente invento podem inibir tanto tumores dependentes de HGF como independentes de HGF.

Os seguintes exemplos não limitativos ilustram vários aspetos do presente invento.

Nos exemplos abaixo, os anticorpos de controlo IgG2 e IgG4 humanizados e IgG de murídeo (também por vezes referido como mIgG1) são anticorpos de controlo do isotipo não relacionados com os presentes anticorpos de c-Met. Os anticorpos C8, D11, e optD11 são anticorpos de murídeo. Em todos os casos, o HGF humano é obtido a partir de R&D Systems (#294).

Exemplo 1

Anticorpos de c-Met

As sequências de aminoácidos das regiões

variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada, tais como cadeias leves e pesadas completas, e as respectivas sequências nucleotídicas codificadoras das anteriores, dos presentes anticorpos humanos modificados estão listadas abaixo na seção intitulada "Sequências de Aminoácidos e Nucleotídicas". As sequências de aminoácidos das CDR de cadeia leve e cadeia pesada são mostradas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. CDR de Cadeia Leve

Anticorpo	CDR 1	CDR 2	CDR 3
D11-S17Y	SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49)	GTSYLAS (SEQ ID NO: 50)	QQWSSYPYS (SEQ ID NO: 51)
D11-8B8	SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49)	GTSYLAS (SEQ ID NO: 50)	QQWSSYPYS (SEQ ID NO: 51)
D11-C27G3	SVSSSISSTNLH (SEQ ID NO: 49)	GTSRLRS (SEQ ID NO: 52)	QQWSSYPYS (SEQ ID NO: 51)
Sequência de Consenso de D11	--	GTSX ₁ LX ₂ S (SEQ ID NO: 87)	--
C8-6	SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 53)	STSNLAS (SEQ ID NO: 54)	IQYSGYPLT (SEQ ID NO: 55)
C8-H241	SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 53)	STSNLAS (SEQ ID NO: 54)	QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 56)
C8-co-16	SVSSSVRSIYLH (SEQ ID NO: 57)	STSNLAS (SEQ ID NO: 54)	QVYRGYPLT (SEQ ID NO: 58)
Sequência de Consenso de C8	SVSSSVX ₃ SIYLH (SEQ ID NO: 88)	--	X ₄ X ₅ YX ₆ GYPLT (SEQ ID NO: 89)
<p>X₁ é Y ou R, e X₂ é A ou R; X₃ é S ou R; X₄ é I ou Q, X₅ é Q ou V, e X₆ é S ou R;</p>			

Tabela 2. CDR de Cadeia Pesada

Anticorpo	CDR 1	CDR 2	CDR 3
D11-S17Y	GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59)	WIYPVTGDTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 60)	GYGAFYY (SEQ ID NO: 61)
D11-8B8	GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59)	WIYPVTGDTYYIEKFKG (SEQ ID NO: 62)	GYGAFFY (SEQ ID NO: 63)
D11-C27G3	GYTFTSRYIH (SEQ ID NO: 59)	WIYPVTGDTYYREPFKG (SEQ ID NO: 64)	GYGAFYY (SEQ ID NO: 61)
Sequência de consenso de D11	--	WIYPVTGDTYYX ₇ EX ₈ FKG (SEQ ID NO: 90)	GYGAFX ₉ Y (SEQ ID NO: 91)
C8-6	GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65)	RVNPNRRGGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 66)	TNWL DY (SEQ ID NO: 67)
C8-H241	GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65)	RVNPNRRGGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 68)	ANWL DY (SEQ ID NO: 69)
C8-co-16	GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65)	RVNPNRRGGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 70)	ANIL DY (SEQ ID NO: 71)
Sequência de consenso de C8	--	RVNPNX ₁₀ RX ₁₁ X ₁₂ TTYNQKFEG (SEQ ID NO: 92)	X ₁₃ NX ₁₄ LDY (SEQ ID NO: 93)

X₇ é N, I, ou R, e X₈ é K ou P;
X₉ é Y ou F;
X₁₀ é N ou Y, X₁₁ é G ou R, e X₁₂ é G ou S;
X₁₃ é T ou A, e X₁₄ é W ou I;

As sequências de consenso para as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas dos anticorpos D11 e C8 são:

Sequência de Consenso da Região Variável da Cadeia Leve do Anticorpo D11 (SEQ ID NO: 94)
EIVLTQSPGTL₁SLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQK₂PGQAPRI₃LLIY
GTSX₁LX₂SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFG
QG₃TKLEIK

em que X₁ é Y ou R, e X₂ é A ou R;

Sequência de Consenso da Região Variável da Cadeia Leve do Anticorpo C8 (SEQ ID NO: 95)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVX₃SIYLHWYQQKPGKAPKLLIY
 STSNLASGVPSRFSGSGSGTIDFTLTISLQPEDFATYYCX₄X₅YX₆GYPLTFG
 GGTKVEIK

em que X₃ é S ou R, X₄ é I ou Q, X₅ é Q, ou V, e X₆ é S ou R;

Sequência de Consenso da Região Variável da Cadeia Pesada do Anticorpo D11 (SEQ ID NO: 96)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYPHWVRQAPGQGLEWMGW
 IYPVTGDTYYX₇EX₈FKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGY
 GAFX₉YWGQGTLLVTVS

em que X₇ é N, I, ou R, X₈ é K ou P, e X₉ é Y ou F;

Sequência de Consenso da Região Variável da Cadeia Pesada do Anticorpo C8 (SEQ ID NO: 97)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGR
 VNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEGRVMTTIDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARX₁₃
 NX₁₄LDYWGQGTITVTVS

em que X₁₀ é Y ou N, X₁₁ é G ou R, X₁₂ é S ou G, X₁₃ é A ou T, e X₁₄ é I ou W.

Os anticorpos são expressos transientemente em células HEK293 EBNA (Edge BioSystems, #90500130) utilizando procedimentos de transfeção padrão. As células transfetadas são cultivadas em meio isento de soro padrão contendo geneticina (G418) e tobramicina durante 48 a 120 horas a 37°C após transfeção. Os anticorpos são purificados numa coluna de rProteína A-Sepharose de 60 ml (Amersham Biosciences, #17-1279-04) seguindo as instruções do

fabricante, e concentrando e purificando ainda através de cromatografia de exclusão de tamanho (XK50/60 Superdex200, Pharmacia) com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4, como fase móvel. Os anticorpos são então filtrados utilizando Millev-GV, membranas de PVDF, 0,22 µm, 33 mm, (Millipore, # SLGV033RS), e armazenou-se a 4 e 8°C.

O anticorpo de c-Met IgG1 de murídeo 5D5 (Patente U.S. No. 5686292), discutido em muitos dos exemplos abaixo, é isolado e purificado a partir do hibridoma HB-11895 obtido a partir da American Type Culture Collection, Manassas, VA, tal como descrito acima.

Exemplo 2

Cinética de Ligação dos Anticorpos de c-Met a Vários

Domínios Extracelulares de c-Met

Os domínios extracelulares (ECD) das sequências de c-Met humano, de macaco cinomolgo, e de rato são expressos como proteínas de fusão de Fc com uma etiqueta flag e His (Flis-tag) no terminal C do Fc (SEQ ID NOS: 72-74). Estas proteínas de fusão de Fc de ECD de c-Met são separadamente expressas transientemente em células HEK293 EBNA e purificadas tal como descrito no Exemplo 1.

Um instrumento BIAcore® 2000 é usado para medir a cinética de ligação dos anticorpos de c-Met aos ECD de c-

Met humano, de macaco cinomolgo e rato. As medições são realizadas a 25°C. As amostras são dissolvidas em tampão HBS-EP (cloreto de sódio 150 mM, EDTA 3 mM, tensioativo P-20 a 0,005% (p/v), e ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico 10 mM (HEPES) a pH 7,4; #BR-1001-88). O fragmento F(ab')₂ do anticorpo de cabra anti-IgG humano, fragmento F(ab')₂ específico (Jackson Immunoresearch Inc, #109-006-097) é imobilizado em células de fluxo 1 a 4 de um *chip* sensor CM5 ao nível de 4000 unidades de resposta (RU) usando química de acoplamento de amina para capturar anticorpos anti-c-Met.

A ligação é avaliada utilizando múltiplos ciclos. Cada ciclo é realizado a um caudal de 50 µL/min., e consiste nos seguintes passos: injeção de cerca de 10 µL de um anticorpo de c-Met a 10 µg/ml com o objetivo de uma captura de 40-100 RU, injeção de 250 µl de ECD de c-Met-Flis-Fc humano, de cinomolgo, ou rato (começando a 100 nM e utilizando diluições em série de duas vezes para cada ciclo) seguido de 20 min. para dissociação, e regeneração utilizando cerca de 30 µl de cloridrato de glicina 10 mM , pH 1,5. As taxas de associação e dissociação para cada ciclo são avaliadas utilizando um modelo de "ligação 1:1 (Langmuir)" no suporte lógico BIAevaluation, versão 4.1. Para a ligação do anticorpo D11-S17Y ao ECD de c-Met-Flis-Fc de rato, é utilizado um modelo de ligando heterogêneo para ajustar os dados de forma adequada; portanto, são obtidas duas afinidades de ligação.

Os resultados são mostrados nas Tabelas 3-5 abaixo.

Tabela 3

Cinética de Ligação e Afinidade dos Anticorpos de c-Met com ECD de c-Met-Flis-Fc Humano			
Anticorpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
D11-8B8	$1,0 \pm 0,1 \times 10^5$	$0,5 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$0,5 \pm 0,2$
D11-C27G3	$6,4 \pm 0,2 \times 10^4$	$0,9 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$1,4 \pm 0,3$
D11-S17Y	$0,7 \pm 0,1 \times 10^5$	$2,8 \pm 0,1 \times 10^4$	$4,2 \pm 0,9$
C8-H241	$1,1 \pm 0,3 \times 10^5$	$<10^{-5}$	$<0,1$
C8-6	$1,6 \pm 0,4 \times 10^3$	$3 \pm 2 \times 10^{-4}$	4 ± 1
C8-co16	$1,1 \pm 0,2 \times 10^5$	$0,3 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$0,3 \pm 0,1$

Tabela 4

Cinética de Ligação e Afinidade de Anticorpos de c-Met com ECD de c-Met-Flis-Fc de Macaco Cinomolgo			
Anticorpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
D11-8B8	$0,78 \pm 0,02 \times 10^5$	$2,23 \pm 0,07 \times 10^{-4}$	$2,9 \pm 0,2$
D11-C27G3	$0,5 \pm 0,1 \times 10^5$	$3,2 \pm 0,4 \times 10^{-4}$	$6,5 \pm 0,7$
D11-517Y	$0,70 \pm 0,08 \times 10^5$	$3,6 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	$5,1 \pm 0,2$
C8-H241	$0,80 \pm 0,06 \times 10^5$	$<10^{-5}$	$<0,2$
C8-6	$1,4 \pm 0,5 \times 10^5$	$4,5 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$3,6 \pm 1,1$
C8-co16	$1,03 \pm 0,02 \times 10^5$	$<10^{-5}$	$<0,1$

Tabela 5

Cinética de Ligação e Afinidade de Anticorpos de c-Met com ECD de c-Met-Flis-Fc de Rato						
Anticorpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)	k_{on} 1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
D11-8B8	$2,1 \pm 0,2 \times 10^5$	$1,9 \pm 0,3 \times 10^{-4}$	$0,89 \pm 0,04$			
D11-C27G3	$1,3 \pm 0,1 \times 10^5$	$3,4 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	$2,7 \pm 0,2$			
D11-S17Y	$0,66 \times 10^5$	189×10^{-4}	286	$2,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-4}$	1,2

Estes dados demonstram que os anticorpos C8-H241, C8-6, e C8-co16 se ligam tanto ao ECD de c-Met humano como de macaco cinomolgo com afinidade semelhante, mas não ao ECD de c-Met de rato. Dados adicionais (não mostrados) indicam que estes anticorpos não se ligam ao ECD de c-Met de ratinho até 100 nM de anticorpo com ECD a 1 µg/ml revestido em placas de ELISA. Os anticorpos D11-8B8, D11-C27G3, e D11-S17Y, no entanto, ligam-se ao ECD de c-Met humano, de macaco cinomolgo, e de rato.

Exemplo 3

Mapeamento de Epitopos

Os epitopos dos presentes anticorpos de c-Met são mapeados através de uma combinação de espectrometria de massa de permuta de hidrogénio-deutério (HDXMS) (Yamada *et al.* (2002) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16(4): 293-299) e marcação de dietil-pirocarbonato (DEPC) (Mendoza *et al.* (2008) *Analy. Chem.* 80(8): 2895-2904). A reação de permuta

de hidrogénio-deutério do domínio Sema de c-Met humano é realizada na presença ou ausência de anticorpos de c-Met. As regiões do domínio Sema que ganham menos deutério na presença de um anticorpo que na sua ausência são identificadas como o ou os epitopos para o anticorpo. DEPC pode reagir com grupos amino de resíduos de lisina ou histidina expostos à superfície do domínio Sema, formando carbamato de etilo de lisina ou histidina. Se estes aminoácidos estiverem localizados na região do epitopo, estarão protegidos, e não reagirão com DEPC após a ligação do anticorpo. Isto ajuda a localizar melhor e/ou confirmar as regiões de epitopo determinadas através de HDXMS.

Expressão e Purificação do Domínio Sema de c-Met.

O domínio Sema de c-Met humano é expresso com uma etiqueta Flis no terminal C (SEQ ID NO: 76) em células HEK293 EBNA e purificado tal como descrito nos Exemplos 1 e 2. A proteína purificada é então armazenada a 4°C em PBS a pH 7,4. Este domínio liga-se aos anticorpos de c-met do presente invento com uma afinidade semelhante à do ECD de c-Met humano inteiro, indicando que os epitopos para estes anticorpos estão localizados nesta região do c-Met humano.

Desglicosilação e Dessialilação do Domínio Sema de c-Met.

100 µl de solução de domínio Sema de c-Met humano a 1,2 mg/ml são tratados com 1 µl de solução de PNGase F (Prozyme, GKE-5006B) a 37°C de um dia para o outro para des-N-glicosilação. A análise de LC/MS demonstra que a maior parte da proteína é desglicosilada após este

tratamento. Separadamente, 100 μ L de solução de domínio Sema de c-Met humano a 1,2 mg/ml são tratados com 2 μ l de solução de neuraminidase a 10 U/ml (Roche, Cat. # 10 269 611 001) a 37°C durante 1 hora para desialilar o domínio Sema.

Formação de Complexos Domínio Sema de c-Met/Anticorpo. 10 μ l de solução de domínio Sema de c-Met desglicosilado (1,2 mg/ml) são misturados com uma alíquota contendo 29 μ g de proteína da solução de anticorpo (2,07 μ l de C8-H241, 2,01 μ l de D11-8B8, ou 3,87 μ l de um mAb de controlo não relacionado), e em seguida dilui-se com solução de PBS 1 \times até um volume final de 40 μ l. Separadamente, 5 μ l de solução de domínio Sema de c-Met humano dessialilado (1,2 mg/ml) são misturados com uma alíquota contendo 14 μ g de proteína da solução de anticorpo (1,04 μ l de C8-H241, 1,01 μ l de D11-8B8, ou 1,94 μ l do mAb de controlo não relacionado), e depois diluiu-se com solução de PBS 1 \times até um volume final de 15 μ l. Cada uma das soluções misturadas de cada anticorpo é então sujeita a análise de HDXMS.

Ensaio HDXMS. 4 μ l de mistura de domínio Sema de c-Met desglicosilado ou dessialilado/anticorpo são misturados com 16 μ l de D₂O a 100% (Acros, Code 166310500; D a 80% durante a permuta), e incubou-se à temperatura ambiente durante 90 segundos. A permuta é então extinta com 50 μ l de ácido fórmico 0,5% (v/v) em água a 0°C. A solução extinta é imediatamente tratada com 2 μ l de solução de

pepsina a 5 mg/ml (v/v) (Sigma, Cat. # P6887) a 0°C durante 3,5 ou 4 min. A solução digerida é imediatamente injetada manualmente numa coluna de RP-HPLC (Polymer Laboratories, Part #1912-1802; 2,1 × 50 mm, tamanho de poro de 1000 Å, tamanho de partícula 8 µM). O fluxo do tampão de HPLC a partir da bomba de HPLC (Waters, 2795 HPLC) passa através de um tubo de metal (aproximadamente 1 ml) para um injetor manual. O eluato da coluna é então passado para um espectrómetro de massa Micromass LCT Premier ou SYNAPT. O tubo de metal, a volta do injetor, e a coluna estão submersos num banho de água gelada.

A coluna é equilibrada com A a 99% (TFA (ácido trifluoroacético) aquoso a 0,05% (v/v)) e B a 1% (TFA a 0,04% (v/v) em acetonitrilo) a um caudal de 0,2 ml/min. Uma eluição de gradiente isocrático é realizada durante 1 min., de 1 até 10% de B durante 1 min., até 40% de B ao longo de 12 min., até 90% de B ao longo de 4 min. com um intervalo de 3 min., e depois regresso rápido às condições iniciais. A espectrometria de massa é realizada num Espectrómetro de Massa Micromass LCT Premier com uma pulverização positiva, modo W e as seguintes definições: uma voltagem capilar de 1,5 kV, uma voltagem do cone de 100 V, Abertura 1 de 25 V, uma gama de massas de 200 a 2000, uma temperatura de dessolvatação de 150°C, e um fluxo gasoso de dessolvatação de 500 l/h. O espectro de massa de cada péptido de c-Met é obtido após permuta D/H com ou sem o anticorpo de c-Met. A massa média de cada péptido é calculada de acordo com a distribuição isotópica do pico iónico mais intenso.

Marcação com DEPC de Complexos de c-Met/Anticorpo. 8,3 µl de solução de domínio Sema de c-Met humano a 1,2 mg/ml são misturados com uma solução de anticorpo (24 µg de proteína: 1,71 µl de C8-H241, 1,67 µl de D11-8B8, ou 3,2 µl de mAb de controlo não relacionado), e solução de PBS 1× para um volume final de 76 µl. Cada mistura de c-Met/anticorpo é tratada com 4 µl de DEPC a 10 mg/ml (p/v) em isopropanol à temperatura ambiente durante 5 min. e depois extinta com 10 µl de histidina a 20 mg/ml em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8, e 10 µl de lisina a 0,2 mg/ml em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8. Cada solução é misturada com 5 µl de solução de tripsina suína a 0,2 mg/ml (p/v) (Promega, Cat. # V528A), e metade da mistura é misturada com 0,5 µl de solução de ditioneitol a 50 mg/ml (p/v). Cada solução de amostra é incubada a 37°C durante 5 horas e depois tratada com 0,5 µl de solução de PNGase F durante mais uma hora. Cada solução digerida é acidificada com 2 µl de solução de ácido acético a 10% (v/v). 2 µl de solução de TCEP (cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina) (Sigma, Cat. # C4702-2G) a 100 mg/ml são adicionados ao digerido não reduzido sem adição de ditioneitol. Cada uma das soluções é submetida a análise de LC/MS utilizando um espectrómetro de massa Waters Acquity UPLC e Waters SYNAPT. A HPLC utiliza uma coluna Waters Acquity UPLC BEH C8 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm, Waters, parte #186002877) a 60°C, e os péptidos são eluídos com um gradiente de acetonitrilo num sistema de fase móvel de HPLC água/acetonitrilo/TFA. Um tempo de corrida de 45 min. é utilizado para as digestões. A coluna é equilibrada com A a 99% (solução aquosa de TFA a

0,05% (v/v)) e B a 1% (TFA em acetonitrilo a 0,04% (v/v)) a um caudal de 0,2 ml/min. É realizada uma eluição em gradiente em estado isocrático durante 2 min., de 1 até 25% de B ao longo de 25 min., até 45% de B ao longo de 10 min., até 90% de B ao longo de 1 min., com 1,5 min. de paragem (no mesmo período de tempo, caudal de 0,3 ml/min.), e depois regresso rápido a 1% de B.

Resultados. O mAb C8-H241 parece ligar-se a um epitopo conformacional que compreende quatro regiões do domínio Sema de c-Met, localizados na cadeia α do domínio extracelular de c-Met humano (resíduos de aminoácidos 25-307 de SEQ ID NO: 75):

121VVDTYDDQL₁₃₀ (SEQ ID NO: 77),
131ISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 78),
179ALGAKVLSSVKDRFINFF₁₉₆ (SEQ ID NO: 79), e
216VRRLKETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 80).

Mais particularmente, o mAb C8-H241 liga-se a c-Met através da interação com um ou mais resíduos de aminoácidos dentro de:

123DTYYDD₁₂₈ (SEQ ID NO: 81) inclusive,
144HVFPNHNTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 82) inclusive,
192FINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 83) inclusive, e
220KETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 84) inclusive.

A ligação do mAb C8-H241 à região 144HVFPNHNTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 82) torna-o capaz de se ligar ao domínio extracelular de c-Met tanto humano (SEQ ID NO: 75) como de macaco cinomolgo (aminoácidos 25 a 932 de SEQ

ID NO: 73) com afinidade comparável, mas não ao c-Met de rato ou de ratinho, até 100 nM de anticorpo em ensaios de ligação.

A ligação do mAb D11-8B8 à cadeia α do domínio Sema de c-Met parece estar localizada numa região, *i.e.*, os resíduos de aminoácido dentro de um epítipo linear dentro da sequência de aminoácidos ⁸⁴YKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANL₁₀₇ (SEQ ID NO: 85) inclusive, mais particularmente na região ⁹⁵CFPCQDCSSKA₁₀₅ (SEQ ID NO: 86) inclusive. O epítipo para Mab D11-8B8 é ainda confirmado através de experiências de extração de epítipo (Dhungana *et al.* (2009) *Methods Mol. Biol.* 524:87-101). O domínio Sema de c-Met é digerido com tripsina suína (Promega) e o digerido é então misturado com o mAb D11-8B8 biotinilado, utilizando o estojo EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Prod. #1754210), para ligar os péptidos c-Met. O D11-8B8 biotinilado com ou sem péptidos c-Met ligados é capturado por resina de Streptavidina-agarose de elevada capacidade (Thermo Scientific, Prod. # 20359). Os péptidos ligados são libertados através de ácido fórmico a 0,15% (v/v) em H₂O, e depois identificados através de LC/MS.

Exemplo 4

Ligação Preferencial de Anticorpos a ECD de c-Met vs. RON e PlexinA2

As proteínas humanas com a maior identidade de sequência com c-Met são RON e Plexina A2. Esta experiência

compara a especificidade da ligação do anticorpo de c-Met aos ECD de c-Met, RON, e PlexinA2.

Poços de placas de 96 poços de elevada ligação de EIA/RIA (Costar, #2592) são revestidos com 100 µl de fusão domínio extracelular de c-Met humano (ECD)-Fc-Flis (SEQ ID NO: 72) a 1 µg/ml, RON-ECD-Fc (R&D Systems, #1947-MS), ou PlexinA2-ECD-Fc (Abnova, Taipei, Taiwan #H00005362-P01) em tampão de revestimento (BioFX Labs, # COAT-1000-01) de um dia para o outro a 4°C. Os poços são aspirados e os locais de ligação não específica são bloqueados através da adição de 200 µl de tampão de bloqueio (solução tamponada com Tris, pH 8,0, com polissorbato 20 (Tween-20) (TBS-T) a 0,05% (v/v) (BioFX Labs, # WSHW-1000-01) mais albumina de soro bovino (BSA) a 1% (p/v) (Jackson Immuno, #001-000-162) e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente. Após as placas serem lavadas três vezes com tampão de lavagem (TBS-T), são adicionados 100 µl/poço de diluições em série 1:6 dos anticorpos de c-Met em tampão de bloqueio (começando a partir de 100 µg/ml) e incubados à temperatura ambiente durante 2 horas. As placas são lavadas e incubadas com 100 µl/poço de IgG de cabra anti-F(ab)₂ humano conjugado com HRP (Jackson ImmunoResearch Labs #109-036-097) em tampão de bloqueio durante 90 min. Após as placas serem lavadas, são adicionados 100 µl/poço de solução de substrato (BioFx, #TMBW-1000-01) e as placas são incubadas durante 10 min. à temperatura ambiente. São adicionados 100 µl/poço de solução de paragem (BioFx, # LSTP-1000-01) para parar a reação. Os sinais colorimétricos são revelados e lidos a

(continuação)

D11-8B8			D11-C27G3			D11-S17Y		
ECD de c-Met	ECD de RON	Plexi-na A2	ECD de c-Met	ECD de RON	Plexi-na A2	ECD de c-Met	ECD de RON	Plexi-na A2
Erro Padrão								
0,006	0,003	0,003	0,0087	0,0017	0,0106	0,00515	0,0012	0,00035
0,011	0,002	0,002	0,0194	0,00595	0,00185	0,0228	0,00065	0,01725
0,012	0,002	0,001	0,0051	0,0018	0,0017	0,01195	0,0058	0,0079
0,007	0,017	0,003	0,01495	0,0006	0,00335	0,00375	0,0013	0,00035
0,092	0,007	0,004	0,02935	0,00695	0,0017	0,04195	0,00075	0,0039
0,044	0,002	0,001	0,2742	0,0002	0,0015	0,0841	0,0054	0,00015
0,069	0,005	0,002	0	0,01505	0,0043	0	0,0029	0,0061
0,000	0,007	0,000	0	0,00275	0,0066	0	0,00445	0,00455
0,000	0,005	0,004	0	0,0063	0,0032	0	0,00485	0,0089
0,000	0,003	0,005	0	0,00975	0,00535	0	0,00705	0,0055
0,000	0,007	0,004	0	0,03125	0,03495	0	0,0007	0,0035
0,000	0,016	0,006	0,0789	0,07335	0,14345	0	0,00865	0,004

Exemplo 5**Os Anticorpos de c-Met Bloqueiam a Ligação HGF/c-Met**

São utilizados ensaios de ligação *in vitro* para determinar a inibição da ligação de HGF a c-Met através dos presentes anticorpos de c-Met.

Poços de placas de 96 poços de EIA/RIA de elevada ligação (Costar, #2592) são revestidos com 100 µl de ECD de c-Met humano-Fc-Flis (SEQ ID NO: 72) (2 µg/ml) em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) de um dia para o outro à temperatura ambiente; lavados quatro vezes

com tampão de lavagem (solução salina tamponada com Tris, pH 8,0, com polissorbato 20 (TWEEN®-20) a 0,05% (v/v) (TBS-T) (BioFX Labs, # WSHW-1000-01) numa máquina de lavar placas; bloqueados através da adição de 300 µl de tampão de bloqueio (TBS-T mais albumina de soro bovino (BSA) (Jackson Immuno, #001-000-162) a 1% (p/v); e incubando-se durante 60 min. a 37°C. O tampão de bloqueio é então removido dos poços e são adicionados 50 µl de anticorpos em tampão de bloqueio nas concentrações finais tal como indicado na Tabela 7 a cada poço, respetivamente. O tampão de bloqueio é adicionado aos poços de controlo de apenas HGF. As placas com anticorpos de c-Met são incubadas durante 90 min. a 37°C. São então adicionados 50 µl de fator de crescimento de hepatócitos humano (HGF) (R&D Systems, #294) em tampão de bloqueio a uma concentração final de 10 ng/ml a cada poço exceto aos poços de controlo com apenas anticorpo. As placas contendo a mistura de anticorpo de c-Met/HGF são incubadas num agitador de placas durante duas horas à temperatura ambiente. Os poços são então lavados quatro vezes com TBS-T numa máquina de lavar placas. De seguida, são adicionados a cada poço 100 µl de anticorpo anti-HGF biotinilado (R&D Systems, # BAF294) em tampão de bloqueio a uma concentração final de 100 ng/ml. As placas são incubadas durante 90 min. à temperatura ambiente. As cavidades são novamente lavadas quatro vezes com TBS-T numa máquina de lavar placas. São adicionados a cada poço 100 µl de uma diluição 1:200 de estreptavidina-peroxidase de rábano (HRP) (R&D Systems, DY998) em tampão de bloqueio. As placas são incubadas durante 30 min. à temperatura

ambiente. Os poços são lavados quatro vezes com TBS-T numa máquina de lavar placas. São então adicionados 100 µl/poço de solução de substrato (BioF_x, #TMBW-1000-01), e as placas são incubadas durante 10 min. à temperatura ambiente. Para parar a reação, são adicionados 100 µl/poço de solução de paragem (BioF_x, # LSTP-1000-01). As amostras são lidas a um comprimento de onda de 450-570 nm num leitor de microplacas (Spectra, MAX 190) e sem subtrair o fundo.

Tal como mostrado na Tabela 7, ambos os anticorpos C8 e D11 de c-Met do presente invento bloqueiam a ligação HGF/c-Met humano.

Tabela 7

Inibição da Ligação de HGF Humano a c-Met Humano pelos Anticorpos C8 e D11								
Méd. A450 nm								
Dose de anti- corpo (ng/ml)	hIgG2	D11-8B8	D11-27G3	D11-S17Y	hIgG4	C8-6	C8-H241	C8-co16
0,00	2,43	2,43	2,43	2,43	2,61	2,61	2,61	2,61
0,48	2,46	2,51	2,37	2,15	2,41	2,56	2,45	2,05
1,91	2,87	2,48	2,31	1,98	2,49	2,59	2,46	2,18
7,63	2,70	2,41	2,27	2,08	2,88	2,64	2,53	2,20
30,52	2,41	2,32	2,38	2,07	2,63	2,42	2,42	2,08
122,07	2,52	1,92	1,60	1,69	2,44	2,00	1,77	1,30
488,28	2,53	1,30	0,94	1,29	2,44	1,33	0,73	0,70
1953,13	2,43	1,43	0,97	1,23	2,27	1,08	0,68	0,60
7812,50	2,50	1,24	0,91	1,12	2,49	0,95	0,70	0,57
31250,00	2,50	1,31	0,94	1,17	2,67	0,98	0,77	0,56
125000,00	2,43	1,38	0,89	1,35	3,00	1,32	0,69	0,38

(continuação)

Dose de anti- corpo (ng/ml)	hIgG2	D11-8B8	D11-27G3	D11-S17Y	hIgG4	C8-6	C8-H241	C8-co16
				ErrP				
0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,10	0,10	0,10	0,10
0,48	0,02	0,13	0,01	0,09	0,24	0,02	0,14	0,15
1,91	0,27	0,08	0,08	0,03	0,00	0,03	0,16	0,12
7,63	0,14	0,01	0,21	0,08	0,14	0,03	0,06	0,09
30,52	0,09	0,02	0,31	0,09	0,16	0,01	0,03	0,01
122,07	0,09	0,07	0,03	0,02	0,08	0,10	0,02	0,03
488,28	0,00	0,04	0,04	0,02	0,01	0,02	0,00	0,01
1953,13	0,13	0,16	0,02	0,05	0,00	0,01	0,01	0,01
7812,50	0,04	0,01	0,01	0,02	0,25	0,07	0,01	0,02
31250,00	0,06	0,02	0,02	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
125000,00	0,07	0,03	0,01	0,08	0,13	0,47	0,01	0,00

Abreviaturas: Méd. = média; ErrP = Erro Padrão

Exemplo 6

Os Anticorpos de c-Met Induzem Fraca Fosforilação de c-Met em Comparação com o Fator de Crescimento de Hepatócitos e o mAb Agonista 5D5

Após estimulação com HGF, a linha celular de carcinoma do pulmão A549 apresenta aumento da fosforilação de c-Met no resíduo de tirosina 1349. É utilizado um ensaio ELISA de c-Met fosforilado (p-Met) para medir a atividade agonística de vários anticorpos de c-Met na ausência de HGF, bem como do mAb 5D5 e do próprio HGF.

Células A549 (ATCC, #CCL-185) são cultivadas em meio F12K de Ham + glutamina 2 mM (Invitrogen, # 21127-022) +

FBS a 10% (Invitrogen, #10082). As células são plaqueadas a 6×10^4 células/poço no meio de soro completo tal como acima em placas de 96 poços e incubou-se de um dia para o outro a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). O meio é removido dos poços e as células são privadas de nutrientes em 100 µl de meio F12K de Ham + glutamina 2 mM + FBS a 0,5% durante seis horas a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). Os anticorpos ou o HGF são diluídos no meio de cultura de privação de nutrientes, adicionados às concentrações finais indicadas na Tabela 8, e incubados durante 15 min. a 37°C. O meio é aspirado e células são lisadas em 50 µl de tampão de lise (Tris 10 mM (Invitrogen, #15567-027), NaCl 150 mM, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 2 mM (Invitrogen, #15575-038), NaF 50 mM (Sigma, #S1504), octilfenoxi-polietoxi-etanol a 1% (v/v) (TRITON®-X 100; Sigma, #T8787), ortovanadato de sódio 2 mM (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, #567540), inibidor de proteases (Sigma, St. Louis, MO; #P8340), mistura I de inibidores de fosfatases (Sigma #P2850), e mistura II de inibidores de fosfatases (Sigma #P5726)) por poço e incubou-se em gelo durante 15-20 min. Os lisados celulares são utilizados no ensaio ELISA descrito abaixo para determinar a fosforilação de c-Met no resíduo Y1349.

O anticorpo de captura de c-Met é diluído em tampão de revestimento Bup H (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, #28382) até 2 µg/ml, adicionado a placas de ELISA (Greiner Bio-One, Monroe, NC, #655081) e incubado de um dia para o outro a 4°C. Os poços são aspirados, lavados

três vezes com TBS-T (BioFX, Owings Mills, MD, WSH-1000-01), e depois bloqueados com 200 µl de tampão de bloqueio (TBS-T mais BSA a 2% (p/v)) durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas são lavadas três vezes com TBS-T. Em seguida, são adicionados 25 µl de lisados celulares mais 75 µl de tampão de bloqueio, e as placas são incubadas de um dia para o outro a 4°C. As placas são então lavadas três vezes com TBS-T. 100 µl de anticorpo policlonal de c-Met pY1349 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, #3133) a 0,5 µg/ml em tampão de bloqueio são adicionados a cada poço, e incubados durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas são então lavadas três vezes com TBS-T. 100 µl de anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, #111-035-144) diluído 1/10000 em tampão de bloqueio são adicionados a cada poço e incubados 1 hora à temperatura ambiente. As placas são então lavadas três vezes com TBS-T. São adicionados a cada poço 100 µl de solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BioFX, #TMBW-1000-01), seguidos da adição de 100 µl de solução de paragem (BioFX, #LSTP-1000-01). As placas são lidas a 450 nm num leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e os valores da amostra são determinados utilizando o suporte lógico SOFTmax Pro 4.8 (Molecular Devices).

Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8

Efeito de Anticorpos de c-Met, HGF, e mAb Agonista 5D5 na Fosforilação de c-Met em Células A549

Conc. de Ab (µg/ml)	Sinal de p-Met de C8-H241	Sinal de p-Met de C8-6	Sinal de p-Met de hlgG4
30	0,333	0,272	0,061
10	0,418	0,334	0,077
3,333	0,450	0,328	0,068
1,113	0,465	0,365	0,087
0,370	0,340	0,211	0,082
0,123	0,304	0,127	0,067
0,041	0,130	0,125	0,268
0,014	0,078	0,105	0,074
0,005	0,074	0,070	0,074
0,002	0,070	0,081	0,117

Conc. de HGF (ng/ml)	Sinal de p-Met	Conc. de Ab (ng/ml)	Sinal de p-Met do mAb 5D5
300	10,615	5	3,290
100	6,129		
33,33333	2,267		
11,11111	1,0667		
3,703704	0,461		
1,234568	0,211		
0,411523	0,142		
0,137174	0,128		
0,045725	0,100		
0,015242	0,148		

Os dados demonstram que HGF e o mAb agonista de c-Met 5D5 estimulam fortemente a fosforilação de c-Met, enquanto os presentes mAb de c-Met C8-H241 e C8-6 estimulam fracamente a fosforilação de c-Met. São obtidos resultados semelhantes nas linhas celulares HCT116, H460 e MDA-MB-231.

O mAb D11-8B8 produz resultados semelhantes.

Exemplo 7

Os Anticorpos de c-Met Inibem a Fosforilação de c-Met Induzida por HGF

A ligação de HGF a c-Met resulta em fosforilação da tirosina de moléculas de c-Met e ativação da via de sinalização de c-Met. Neste exemplo, a linha celular de cancro do cólon humano HCT116, que responde a HGF, é usada para avaliar a inibição da fosforilação induzida por HGF nos resíduos de tirosina 1230, 1234 e 1235 de c-Met através dos presentes anticorpos de c-Met.

Células HCT116 (ATCC, Manassas, VA, #CCL-247) são ressuspensas a 150000 células/ml em meio 5A de McCoy (Invitrogen, Carlsbad, CA, #16600-082) mais penicilina/estreptomicina (Invitrogen, #15140-122) com soro fetal bovino a 10% (v/v) (FBS) (Invitrogen, #10082-147). 0,2 ml das células HCT116 ressuspensas são adicionados a placas de microtitulação de 96 poços (Corning, Lowell, MA, #3596) a 30000 células/poço, e as células são então incubadas durante 48 horas a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). O meio de cultura é então aspirado e as células são privadas de nutrientes em 100 µl de meio 5A de McCoy mais penicilina/estreptomicina com BSA a 0,1% (p/v) durante 24 horas a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). 25 µl de azida de sódio (concentração final de 0,01% (p/v)) (Sigma, #S2002) são adicionados, seguido imediatamente pela adição de 25 µl de

diluições de 8× de anticorpo de c-Met em meio 5A de McCoy mais penicilina/estreptomicina com BSA a 0,1 % (p/v), e as células são incubadas durante 30 min. a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). 50 µl de HGF a uma concentração final de 200 ng/ml são adicionados a cada poço e as células são incubadas durante mais 15 min. a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). O meio é então aspirado e 50 µl de tampão de lise celular são adicionados (Tris 10 mM (Invitrogen, #15567-027), NaCl 150 mM, ácido etilenodiaminotetraacético 2 mM (EDTA) (Invitrogen, #15575-038), NaF 50 mM (Sigma, #S1504), octilfenoxi-polietoxi-etanol (TRITON®-X100; Sigma, #T8787) a 1% (v/v), ortovanadato de sódio 2 mM (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, #567540), e inibidor completo das proteases, livre de EDTA (Roche, Basel, Suíça, #11836170001). As células são incubadas no tampão de lise à temperatura ambiente durante 15-30 min. Os lisados celulares são ensaiados quanto à fosforilação de tirosina de c-Met através de ELISA como se segue.

O anticorpo de captura de c-Met é diluído em tampão de revestimento (BioFX, Glendora, CA, COAT-1000-01) até 2 µg/ml. 110 µl do anticorpo diluído são adicionados por poço a placas de ELISA (Greiner Bio-One, Monroe, NC, #655081) e as placas são incubadas de um dia para o outro a 4°C. Os poços são aspirados, lavados duas vezes com TBS-T, e depois bloqueados com 200 µl de tampão de bloqueio (TBS-T mais BSA a 2% (p/v)) durante 1 hora. As placas são lavadas duas vezes com TBS-T. Em seguida, são adicionados 25 µl de lisados celulares mais 75 µl de tampão de bloqueio ou 100 µl de diluições de lisados de células MKN45 (diluídas com

tampão de bloqueio, como padrão), e as placas são incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas são então lavadas quatro vezes com TBS-T. 100 µl de anticorpo policlonal de c-Met pYpYpY1230/1234/1235 (Invitrogen, #44-888G) a 0,5 µg/ml em tampão de bloqueio são então adicionados a cada poço, e as placas são incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas são lavadas quatro vezes com TBS-T. 100 µl de anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, #111-035-144) diluído 1/12000 em tampão de bloqueio são então adicionados, e a mistura é incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas são então lavadas seis vezes com TBS-T. 100 µl de solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BioFX, #TMBW-1000-01) são adicionados a cada poço, seguido da adição de 100 µl de solução de paragem (BioFX, #LSTP-1000-01). As placas são lidas a 450 nm com uma correção de 570 nm utilizando um leitor de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A curva padrão é estabelecida utilizando análise de 4 parâmetros, e os valores da amostra são determinados utilizando suporte lógico SOFTmax Pro 3.1.2 (Molecular Devices).

A percentagem de inibição da fosforilação da tirosina de c-Met é definida como a média do tratamento de HGF sem adição do anticorpo de c-Met (0% de inibição), e 100% de inibição é definido como a média do tratamento de azida de sódio (sem HGF ou tratamento de anticorpo de c-Met).

A Tabela 9 mostra a média de tratamentos em triplicado por experiência para três experiências com erros padrão. Os dados demonstram que cinco dos seis anticorpos de c-Met do presente invento inibem significativamente fosforilação da tirosina de c-Met induzida por HGF em comparação com a dos controlos do isotipo IgG2 e IgG4 humanos.

Tabela 9

Percentagem de Inibição da Fosforilação de Tirosina de c-Met Induzida por HGF através dos Anticorpos

C8 e D11

Dose de anticorpos:

10 µg/ml 2 µg/ml 0,4 µg/ml 0,08 µg/ml 0,016 µg/ml 0,0032 µg/ml

Tratamen-

to de Ab	isotipo	média	errp	média	errp	média	errp	média	errp	média	errp	média	errp
D11-8E8	IgG2	19,56	4,68	40,74	8,24	35,04	6,43	10,52	7,41	-6,68	9,48	-10,37	6,79
D11-C27G3	IgG2	1,25	7,55	31,78	7,71	38,10	4,97	20,79	5,72	5,73	8,95	9,72	7,09
D11-S17Y	IgG2	16,73	8,72	31,39	6,43	15,91	6,05	-3,24	10,54	2,53	8,52	9,48	8,51
C8-H241	IgG4	60,08	5,27	62,20	2,10	59,09	3,05	22,09	4,92	14,68	12,40	-12,33	10,18
C8-co-16	IgG4	65,40	3,94	58,96	3,37	45,08	3,44	9,77	9,14	-2,89	10,95	-10,72	5,41
C8-6	IgG4	14,88	10,78	27,94	3,80	16,83	4,36	7,79	7,68	-6,06	8,84	-11,34	8,65
5D5	mIgG1	64,12	3,31	63,75	4,44	42,55	4,27	11,87	7,73	-3,50	9,70	-6,07	5,68
hIgG2	controlo	6,24	5,31	17,53	5,74	9,31	6,56	-1,58	8,16	9,49	6,77	-10,21	6,78
	cb isotipo												
hIgG4	controlo	-1,47	5,76	-6,62	9,07	-16,07	7,01	-21,70	9,09	-7,96	10,97	-14,40	7,37
	cb isotipo												
mIgG1	controlo	5,46	6,31	9,76	9,27	13,43	8,18	-10,59	10,31	-5,42	10,53	-9,76	8,42
	cb isotipo												

		Méd	errp
não		100,00	0,98
tratado			
HGF	200 ng/ml	0,001	2,76

% de inibição de fosfo-Met estimulada por HGF medida através de ELISA

Exemplo 8**Indução de Internalização de c-Met através de Anticorpos de
c-Met**

As experiências descritas neste exemplo empregam análise de separação de células ativadas com fluorescência (FACS) para demonstrar que os presentes anticorpos de c-Met se ligam a moléculas c-Met da superfície celular e induzem a internalização de c-Met. As células MKN45 empregues expressavam constitutivamente níveis elevados de c-Met total, e exibem fosforilação de c-Met independente de HGF em resultado da amplificação do gene *MET*. A internalização de c-Met parece induzir a degradação de c-Met (ver Exemplos 10 e 19), resultando em inibição da via de sinalização de c-Met.

Poços de placas de cultura de tecidos de 6 poços (Costar #3598) são semeados com $1,5 \times 10^5$ células tumorais gástricas humanas MKN45 (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resource Bank, #JCRB0254) em 2 ml de meio de cultura (RPMI-1640 (Invitrogen, #11835); FBS a 10% (v/v) (Invitrogen, #10082); L-glutamina 2 mM (Invitrogen, #25030); penicilina G a 100 U/500 ml, e estreptomicina a 100 µg/500 ml (Invitrogen, #15140)). As placas são incubadas durante 24 horas a 37°C sob humidade relativa a 95% e CO₂ a 5% (v/v). Os anticorpos são então adicionados aos poços a uma concentração final de 5 µg/ml.

Após tratamento de um dia para o outro, o meio de cultura é removido dos poços e substituído com 1 ml de solução de dissociação de células sem enzimas (Chemicon, #S-014-B). As células são colhidas em tubos de centrífuga, após terem sido incubadas durante 5 min. à temperatura ambiente, e lavadas uma vez em meio de cultura seguido por mais uma lavagem em tampão de ligação (DPBS com BSA a 1% (p/v) e azida de sódio a 0,01% (p/v)). Antes das células serem coradas, um anticorpo de c-Met que reconhece um epitopo diferente dos presentes anticorpos de c-Met é marcado através da utilização de um Estoque de Marcação de Anticorpos Monoclonais Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, #A-20181) de acordo com as instruções do fornecedor. 100 µl de tampão de ligação contendo 2 µg/ml do anticorpo marcado com Alexa Fluor 488 são adicionados às células, que são então incubadas durante 60 min. em gelo. As células são então lavadas uma vez com tampão de ligação e ressuspensas em DPBS contendo iodeto de propídio a 2 µg/ml (para corar as células mortas). A quantidade de moléculas de c-Met restantes na superfície das células é analisada através de análise de FACS, e são adquiridos 10000 eventos para cada amostra.

A intensidade média de fluorescência na superfície das células reflete a quantidade de moléculas de c-Met que permanecem na superfície das células após tratamento com anticorpos de c-Met.

Os dados de uma experiência representativa são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10

Efeito dos Anticorpos C8 e D11 na Internalização de c-Met tal como Determinado por Análise de FACS										
Fluorescência Média										
Anticorpo (µg/ml)	hIgG2	D11-8B8	D11-C27G3	D11-S17Y	hIgG4	C8-6	C8-H241	C8-col6	mIgG	5D5
5,00	130,25	44,66	51,09	56,35	135,03	67,88	57,63	56,16	136,47	92,87

Os dados demonstram que a intensidade média de fluorescência na superfície das células tratadas com os presentes anticorpos de c-Met é menor que nas células tratadas com um anticorpo correspondente de controlo do isotipo de IgG ou anticorpo mIgG, indicando que os presentes anticorpos de c-Met induzem internalização de c-Met. Além disso, a intensidade média de fluorescência à superfície das células tratadas com os presentes anticorpos de c-Met é inferior àquela em células tratadas com anticorpo de c-Met agonista de controlo 5D5. A % de internalização pode ser calculada como se segue:

% de internalização = [1-(fluorescência média do anticorpo de teste dividida pela fluorescência média do controlo do isotipo do anticorpo) multiplicada por 100].

Os dados da internalização sugerem que os presentes anticorpos induzem dimerização de c-Met humano. Os dados nos Exemplos 9 e 19 demonstram que os anticorpos C8 e D11 induzem também degradação, e reduzem a fosforilação, de c-Met.

Resultados de internalização complementares são obtidos através de microscopia confocal utilizando anticorpo C8 de murídeo marcado com fluorescência em células MKN45 e Caki-1.

Utilizando os anticorpos C8-H241, C8-6, C8-co-16, e D11 de murídeo, obtêm-se resultados de internalização semelhantes em células de macaco cinomolgo NIH3T3 transfetadas com ácido nucleico codificando c-Met de macaco cinomolgo.

Os anticorpos C8-H241, C8-6, C8-co-16, e optD11 também induzem internalização de c-Met em células NIH3T3 transfetadas com ácido nucleico codificando a mutação M1149T do domínio cinase de c-Met humano. Os anticorpos C8-H241, C8-6, C8-co-16, e D11 de murídeo também induzem a internalização de c-Met em células de cancro do pulmão de células não pequenas H1437 contendo a mutação do domínio justamembranar de c-Met R988C. Ambas as mutações causam ativação constitutiva de ganho de função do c-Met.

Exemplo 9

Inibição por Anticorpo da Proliferação *In Vitro* de Células Tumorais Independente do Ligando

A inibição do crescimento de células tumorais *in vitro* através de anticorpos de c-Met em células MKN45 independentes de HGF na ausência de ligando de HGF é examinada neste ensaio.

Os anticorpos de c-Met e de controlo do isotipo são diluídos com meio de cultura (RPMI-1640 (Invitrogen, #11835), FBS a 10% (v/v), L-glutamina 2 mM (Invitrogen, #25030), penicilina G a 100 U/500 ml, e estreptomicina a 100 µg/500 ml (Invitrogen, #15140)) para alcançar as concentrações finais de 2× indicadas na Tabela 11, e 50 µl das soluções de anticorpo 2× são adicionados a cada poço de placas de cultura de tecidos de 96 poços (PerkinElmer #1450-517). As células MKN45 (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resource Bank, #JCRB0254) são mantidas no meio indicado acima, e são ressuspensas a 1×10^5 células/ml no mesmo meio. 50 µl desta ressuspensão de MKN45 são adicionados a cada poço para se alcançar 5×10^3 células/poço. As placas são então incubadas durante 48 horas a 37°C sob 95% de humidade relativa e CO₂ a 5% (v/v). Durante as últimas seis horas da cultura, as células são pulsadas com timidina-³H (MP Biomedicals, Solon, OH #24066) a 1 µci/poço a 37°C, 95% de humidade relativa, CO₂ a 5% (v/v). O meio é então removido e as células são lavadas uma vez com DPBS. Após isto, são adicionados 200 µl de Optiphase Supermix (PerkinElmer, #1200-439) a cada poço. As placas são seladas e incubadas durante pelo menos uma hora à temperatura ambiente. A timidina-³H incorporada nas células é contada durante 1 min. utilizando um contador de cintilações.

Os dados de uma experiência representativa são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11

Inibição da Incorporação de Timidina-³H em Células MKN45 através de Vários Anticorpos C8 e D11

MÉD. das CFM										
Dose de anticorpo										
(mg/ml)	hIgG2	D11-8B8	D11- 27G3	D11- S17Y	hlgG4	C8-co16	C8-H241	C8-6	mIgG	5D5
20000,0	45054	11239	18407	19752	50628	11738	11425	16387	52448	35086
3333,3	49384	11441	16920	21239	54026	12956	12063	18216	53670	38195
555,6	51720	11925	15987	20936	54204	13476	13217	18334	54655	39496
92,6	47562	11094	14550	21911	54264	12419	11962	23041	52241	39607
15,4	50488	24402	28685	39695	53806	22528	23150	44771	51329	49766
2,6	48491	44741	47034	49868	54765	53465	48761	54598	55463	54967
0,4	46468	43334	43998	45304	55330	47485	46645	53389	51549	49563
0,1	44822	41578	41515	44566	53856	45725	44418	51668	47709	51883
0,0	50427	50427	44213	44213	48708	51478	51478	48708	50300	50300
ErrPAD.										
20000,0	2927	114	1265	1206	2491	262	654	282	1845	764
3333,3	2462	732	641	689	1421	388	386	314	1310	1491
555,6	2166	605	578	267	4364	281	341	1116	1192	534
92,6	1835	22	150	564	1733	352	636	475	1036	370
15,4	2144	2024	941	463	1376	207	1771	422	1281	968
2,6	2587	1914	1133	1910	1978	2164	1945	444	919	2577
0,4	2041	650	1177	2551	1501	378	2392	162	438	1943
0,1	1628	1734	1817	2402	678	1340	2442	1589	2092	3143
0,0	1203	1203	841	841	1377	886	886	1377	777	777

Abreviaturas: MÉD. = média; CFM = contagem por minuto; ErrPAD. = Erro Padrão

Estes dados demonstram que vários anticorpos C8 e D11 de c-Met do presente invento inibem a proliferação de células MKN45 independentes de HGF tal como evidenciado por

uma redução na incorporação de timidina-³H. Resultados semelhantes são obtidos em células tumorais SNU5 e NUGC-4, que exibem sobre-expressão constitutiva e fosforilação de c-Met.

Exemplo 10

Redução do c-Met Fosforilado e Total, e Ausência de Derramamento de Domínio Extracelular de c-Met, em Response a Anticorpos de c-Met

Este exemplo investiga se o tratamento de células MKN45 com anticorpos de c-Met do presente invento resulta em redução do c-Met fosforilado (p-Met) e do c-Met total. Além disso, este ensaio é utilizado para determinar se o tratamento de anticorpos de c-Met induz o derramamento de ECD de c-Met para o meio condicionado por MKN45.

Os anticorpos de c-Met e de controlo do isotipo são diluídos com meio de cultura (RPMI-1640 (Invitrogen, #11835), FBS a 10% (v/v) (Invitrogen, #10082), L-glutamina 2 mM (Invitrogen, #25030), penicilina G a 100 U/500 ml, e estreptomicina a 100 µg/500 ml (Invitrogen, #15140)) para alcançar 2× as concentrações finais indicadas na Tabela 12, e 50 µl das soluções de anticorpo 2× são adicionados a cada poço de placas de cultura de tecidos de 96 poços (Costar, #3596). As células MKN45 (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resource Bank, #JCRB0254) são mantidas no meio indicado acima e são ressuspensas para

1×10^5 células/ml no mesmo meio. 50 μ l desta ressuspensão de MKN45 são adicionados a cada poço para alcançar 5×10^3 células/poço. As placas são então incubadas durante 24 horas a 37°C sob 95% de humidade relativa e CO₂ a 5% (v/v), e os lisados celulares são preparados tal como descrito no Exemplo 7. Além disso, o meio condicionado de cada tratamento é colhido para quantificação de ECD de c-Met. Os níveis de p-Met e c-Met total nos lisados celulares são determinados através de ELISA, e normalizados para a concentração de proteína do lisado (tal como determinado por BCA, Pierce #23225).

c-Met Fosforilado

A fosforilação de c-Met nos resíduos de tirosina 1230, 1234, e 1235 é determinada tal como descrito no Exemplo 7.

c-Met Total e Derramamento de ECD de c-Met

Para os ELISA de c-Met total e de ECD de c-Met, um anticorpo de captura de c-Met é diluído em tampão de revestimento (BioFX, Glendora, CA, COAT-1000-01) até 2 μ g/ml. 110 μ l do anticorpo diluído são adicionados por poço a placas de ELISA (Greiner Bio-One, Monroe, NC, #655081) e as placas são incubadas de um dia para o outro a 4°C. Os poços são aspirados, lavados duas vezes com TBS-T, e depois bloqueados com 200 μ l de tampão de bloqueio (TBS-T mais BSA a 2% (p/v)) durante 1 hora à temperatura ambiente. As

placas são então lavadas duas vezes com TBS-T. Em seguida, lisados de células MKN45, o meio condicionado por MKN45, ou domínio extracelular de c-Met (ECD) (SEQ ID NO: 75) (como padrão), são adicionados, e as placas são incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas são então lavadas quatro vezes com TBS-T. 100 µl de 0,5 µg/ml de um segundo anticorpo de c-Met biotinilado (Mab 5D5) que se liga a um epítipo de c-Met diferente do anticorpo de captura diluído em tampão de bloqueio são então adicionados a cada poço, e as placas são incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas são lavadas quatro vezes com TBS-T. 100 µl de estreptavidina conjugada com peroxidase diluída 1/12000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, #016-030-084) em tampão de bloqueio são então adicionados, e a mistura é incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas são então lavadas seis vezes com TBS-T. 100 µl de solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BioFX, #TMBW-1000-01) são adicionados a cada poço, seguido pela adição de 100 µl de solução de paragem (BioFX, #LSTP-1000-01). As placas são lidas a 450 nm com uma correção de 570 nm utilizando um leitor de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A curva padrão é estabelecida utilizando análise de 4 parâmetros, e os valores da amostra são determinados utilizando suporte lógico SOFTmax Pro 3.1.2 (Molecular Devices).

Tal como mostrado na Tabela 12, o ELISA de p-Met e c-Met total revelou que o tratamento de mAb C8-H241 reduz ao máximo p-Met em 77% e c-Met total em aproximadamente

67%. O tratamento de D11-8B8 reduz ao máximo p-Met em aproximadamente 75% e c-Met total em 63%.

Tal como observado no Exemplo 8, estes dados demonstram que os anticorpos C8 e D11 induzem a degradação de c-Met e reduzem a fosforilação de c-Met.

Os dados na Tabela 12 indicam também que o tratamento com os anticorpos C8-H241 e D11-8B8 de c-Met não induzem clivagem nem derramamento do ECD de c-Met.

Tabela 12

Efeito dos Anticorpos C8 e D11 no c-Met Fosforilado, c-Met Total, e Derramamento de Domínio Extracelular de c-Met em Lisados de Células MKN45 e Meio Condicionado								
Percentagem de inibição de c-Met Fosforilado de MKN45								
Dose de Mab (ng/mL)	C8-H241		hIgG4		D11-8B8		hIgG2	
	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.
10000	77,0	2,4	-2,1	10,9	74,8	3,4	14,0	7,1
1000	74,1	1,3	11,1	9,7	72,8	2,0	-4,6	10,9
100	71,7	2,5	13,4	13,3	69,1	3,7	-7,6	24,4
10	42,3	3,0	5,8	11,3	37,6	5,5	6,1	11,0
	méd.	desvpad.						
não tratado	0,0	8,0						
Percentagem de Inibição de c-Met Total de MKN45								
Dose de Mab (ng/mL)	C8-H241		hIgG4		D11-8B8		hIgG2	
	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.
10000	63,1	1,6	-23,7	4,1	63,0	7,0	14,1	9,1
1000	66,7	4,3	10,4	16,0	62,7	0,6	-2,4	22,4

(continuação)

Porcentagem de Inibição de c-Met Total de MKN45								
Dose de Mab (ng/mL)	C8-H241		hlgG4		D11-8B8		hgG2	
	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.
100	61,5	3,4	-3,7	14,4	62,9	2,5	7,3	9,1
10	32,3	4,9	-3,4	13,5	34,5	8,4	15,1	7,0
	méd.	desvpad.						
não tratado	0,0	25,9						

Nível de ECD de c-Met em Meio Condicionado por MKN45 (ng/mL)								
Dose de Mab (ng/mL)	C8-H241		hlgG4		D11-8B8		hgG2	
	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.	méd.	desvpad.
10000	5,1	0,5	7,4	0,7	6,2	0,2	7,0	0,1
1000	6,1	0,8	7,6	0,4	7,2	0,5	7,2	0,5
100	5,4	0,4	7,6	0,8	6,9	1,6	7,2	0,6
10	6,6	0,2	8,4	1,1	6,2	0,4	7,2	0,1
	méd.	desvpad.						
não tratado	8,3	1,0						

Exemplo 11**Atividade Agonista de Anticorpos em Células Tumerais Caki-1
na Ausência de HGF**

As células de carcinoma renal Caki-1 proliferam em resposta a HGF. A ativação de c-Met em células Caki-1 através de anticorpos de c-Met na ausência de HGF é examinada neste exemplo para avaliar a atividade agonista dos anticorpos de c-Met do presente invento.

Poços de placas de cultura de tecidos de 96 poços são semeados com 5000 células Caki-1 de carcinoma de células claras de rim humano (ATCC, #HTB-46) em meio de cultura 5A de McCoy (Invitrogen, #16600) suplementado com FBS a 10% (v/v), L-glutamina 2 mM (Invitrogen, #25030), penicilina G a 100 U/500 ml e estreptomicina a 100 µg/500 ml (Invitrogen, #15140). Após cultura durante 24 horas, as células são privadas de nutrientes em meio pobre em soro (FBS a 0,5% (v/v)) durante mais 24 horas. As células são então cultivadas na presença de anticorpos anti-c-Met e de controlo em meio pobre em soro nas concentrações finais indicadas na Tabela 13 durante 24 horas a 37°C, 95% de humidade relativa, CO₂ a 5% (v/v). Durante as últimas seis horas da cultura, as células são pulsadas com timidina-³H (MP Biomedicals, Solon, OH #24066) a 1 µci/poço a 37°C, 95% de humidade relativa, CO₂ a 5% (v/v). Em seguida, o meio é removido e as células são lavadas uma vez com DPBS. Após isto, são adicionados 200 µl de Optiphase Supermix (Perkin-Elmer, #1200-439) a cada poço. As placas são então seladas e incubadas durante pelo menos uma hora à temperatura ambiente. A timidina-³H incorporada nas células é contada durante 1 min. utilizando um contador de cintilações.

Os dados de uma experiência representativa são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13

Efeito dos Anticorpos C8 e D11 na Incorporação de ³ H-Timidina em Células Caki-1 na Ausência de HGF										
CPM Méd										
Dose de anticorpo (ng/ml)	hlgG2	D11-8B8	D11-27G3	D11-S17Y	hlgG4	C8-co16	C8-H241	C8-6	mIgG	5D5
20000,0	14658	15866	16054	18616	13704	13112	12797	13194	14224	19893
3333,3	14034	15730	15765	17897	13023	13829	12702	13193	13469	19018
555,6	14048	13997	14536	16620	12393	11359	12116	13494	13200	20043
92,6	14113	13705	14718	15342	12934	11563	12142	12793	13761	15588
15,4	14473	13488	13836	14579	13271	12111	13020	13670	13638	11748
2,6	15517	14097	13325	14867	13858	13713	14407	14126	13766	12520
0,4	14341	14411	13596	14618	13412	14080	14142	14601	14357	12896
0,1	16947	15319	17690	15899	13547	15567	15530	16121	13797	14383
0,0	14992	14992	15237	15237	14622	13889	14622	13889	14531	14531
ErrPAD.										
20000,0	398	737	549	345	219	642	268	96	465	807
3333,3	358	959	538	466	84	1086	380	382	927	954
555,6	343	809	705	284	478	437	216	4	397	505
92,6	428	502	728	237	447	292	445	212	706	394
15,4	232	737	729	160	487	267	305	107	514	318
2,6	386	173	295	404	339	299	291	711	91	221
0,4	357	568	508	392	317	556	656	281	331	323
0,1	262	550	1108	326	381	601	583	536	229	145
0,0	310	310	394	394	364	554	364	554	238	238

Abreviaturas: Méd. = média; CPM = contagens por minuto; ErrPAD. = Erro Padrão

Estes dados demonstram que os anticorpos de c-Met

C8-H241, C8-6, C8-co-16, e D11-8B8 não aumentam significativamente a tomada de timidina-[metil-³H] em células Caki-1 em comparação com a dos controles do isotipo de IgG. D11-C27G3 e D11-S17Y exibem uma estimulação baixa, variável, mas estatisticamente significativa da tomada de timidina-[metil-³H] em células Caki-1 em comparação com a do controle do isotipo de IgG. O anticorpo agonista de c-Met de controle 5D5 induz uma tomada mais forte de timidina-[metil-³H] que a dos presentes anticorpos de c-Met em células Caki-1 sob as mesmas condições experimentais.

Exemplo 12

Atividade Agonista de Anticorpos em Hepatócitos Humanos

Primários na Ausência de HGF

A atividade agonista dos presentes anticorpos de c-Met é ainda avaliada em hepatócitos humanos primários (PHH), que respondem a HGF, na ausência de HGF.

Células PHH plaqueáveis criopreservadas (KQG Celsis, Chicago, IL, RD #00002) são descongeladas a 37°C e ressuspensas a 175000 células/ml em meio InVitroGRO CP (Celsis, #Z99029) com uma mistura de antibióticos torpedo (Celsis, #Z99000). Foram adicionados 0,2 ml de células PHH ressuspensas por poço a placas de microtitulação de 96 poços revestidas com colagénio I (BD, Franklin Lakes, NJ,

#354407) a 35000 células/poço, e as células são incubadas durante 24 horas a 37°C, CO₂ a 5% (v/v). O meio de cultura é então aspirado e 150 µl de meio InVitroGRO HI (Celsis, #Z99009) com mistura de antibióticos torpedo mais BSA a 0,1% (p/v) são adicionados por poço, mais 50 µl de anticorpos de c-Met e de controlo num intervalo de concentrações finais de 10 µg/ml a 0,0032 µg/ml, ou HGF a uma concentração final de 200 ng/ml, em meio InVitroGRO HI com mistura de antibióticos torpedo mais BSA a 0,1% (p/v). As células são incubadas durante 48 horas a 37°C, CO₂ a 5% (v/v), e 10 µl de timidina-[metil-³H] 0,1 mCi/ml (MP Biomedicals, Solon, OH, #24066) são adicionados por poço durante pelo menos 6 horas de incubação. As placas de ensaio são congeladas a -70°C, descongeladas a 37°C, e colhidas para placas UniFilter-96, GF/C (Perkin Elmer, Waltham, MA, #6005174) utilizando um Filtermate Harvester (Perkin Elmer). As placas UniFilter são secas, são adicionados 20 µl por poço de cintilante Microscint 0 (Perkin Elmer, #6013611), e as placas são contadas num contador de cintilações líquidas 1450 Microbeta (Perkin Elmer).

A Tabela 14 mostra a média de tratamentos em triplicado com desvios padrão, e é representativa de três experiências repetidas.

Tabela 14

Efeito de Vários Anticorpos C8 e D11 na Incorporação de ^3H -Timidina em Hepatócitos Humanos Primários na Ausência de HGF													
<u>Doses:</u>													
		10 $\mu\text{g/ml}$		2 $\mu\text{g/ml}$		0,4 $\mu\text{g/ml}$		0,08 $\mu\text{g/ml}$		0,016 $\mu\text{g/ml}$		0,0032 $\mu\text{g/ml}$	
tratamento	isotipo	média	desvpad	média	desvpad	média	desvpad	média	desvpad	média	desvpad	média	desvpad
de Ab													
D11-8B8	IgG2	1703,7	140,1	1427,0	120,3	1231,0	232,4	1122,3	188,3	715,3	25,8	611,0	61,5
D11-C27G3	IgG2	2145,7	171,0	1874,0	443,4	1753,0	199,8	1283,3	131,6	892,0	109,3	692,7	23,0
D11-S17Y	IgG2	3155,0	594,2	2566,0	173,1	1911,0	348,3	1458,7	132,7	919,7	47,5	726,3	131,7
C8-H241	IgG4	671,0	61,0	710,3	81,8	681,3	13,7	669,3	77,0	630,0	37,2	625,0	65,5
C8-co-16	IgG4	952,0	36,0	822,0	88,4	670,0	23,3	767,3	12,6	715,7	12,5	828,7	85,2
C8-6	IgG4	1042,3	91,3	892,3	107,0	801,7	77,4	792,3	48,4	769,7	109,9	736,3	43,1
5D5	mIgG1	4978,0	59,9	4912,3	287,7	3763,7	292,1	3320,7	40,1	1716,3	324,1	821,7	175,3
hIgG2	controle	650,0	39,4	643,7	11,7	711,7	16,6	836,0	61,0	748,3	57,7	799,7	80,3
	cb isotipo												
hIgG4	controle	647,3	77,1	735,0	33,8	717,3	19,4	819,0	44,2	848,3	75,1	806,7	79,7
	cb isotipo												
mIgG1	controle	616,7	24,8	581,0	81,8	601,0	82,0	596,0	78,6	588,7	43,0	675,0	73,0
	cb isotipo												
		méd. desvpad,											
HGF	200 ng/ml	6292,7	733,0										
não tratado		615,1	83,9										

Os dados demonstram que em comparação com os controles do isotipo de IgG, os presentes anticorpos de c-Met C8-H241 não aumentam significativamente a tomada de timidina-[metil- 3] em células PHH; C8-6, C8-co-16, D11-8B8, D11-C27G3, e D11-S17Y exibem uma estimulação baixa, variável, mas estatisticamente significativa da tomada de timidina-[metil- 3 H]. No entanto, a atividade agonista dos

presentes anticorpos de c-Met é significativamente inferior à do anticorpo de c-Met de controlo 5D5. O anticorpo agonista 5D5 estimula a proliferação de PHH de um modo dependente da dose, com um aumento de 5 vezes a uma concentração de 3 µg/ml. A 200 µg/ml, HGF estimula um aumento de 5 vezes na tomada de timidina-³H. O mAb C8-H241 não induz proliferação mesmo quando utilizado a 10 µg/ml.

Resultados semelhantes são obtidos em células epiteliais renais humanas HK2, que também proliferam em resposta à estimulação de HGF.

Exemplo 13

Efeito dos Anticorpos na Morfogênese Tubular em Células

HepG2 na Ausência de HGF

HGF induz alterações morfogénicas tubulares em células HepG2 criadas em Matrigel™ (Becton-Dickinson, #354234), um material de matriz extracelular contendo componentes da membrana basal. Nesta experiência, a atividade agonista semelhante a HGF de anticorpos do presente invento em indução de alterações morfogénicas tubulares em células HepG2 é avaliada.

Células HepG2 (ATCC, #HB-8065) são cultivadas em DMEM suplementado com FBS a 10%. 100 µl de uma solução de Matrigel™ (Matrigel™, Becton-Dickinson) diluído em Opi-MEMI (Invitrogen, #31985) suplementado com FBS a 10% (v/v), L-glutamina 2 mM (Invitrogen, #25030), penicilina G a 100

U/500 ml e estreptomicina a 100 µg/500 ml (Invitrogen, #15140) são plaqueadas em poços de placas de cultura de tecidos de 96 poços (Costar, #3596). Após a solução de Matrigel™ solidificar, são adicionadas 2000 células HepG2 em 50 µl de meio de cultura suplementado com soro a 10%. Em seguida, anticorpos de c-Met e de controlo a uma concentração final de 50 µg/ml, ou HGF a uma concentração final de 50 ng/ml, são adicionados às células. As células são criadas durante 4 dias a 37°C numa atmosfera humidificada contendo CO₂ a 5% (v/v). Após 4 dias, o meio do topo é removido e substituído por 50 µl de violeta de p-Iodonitro-tetrazólio (Sigma, #18377) a 1 mg/mL em PBS, e as células são incubadas durante mais 48 horas sob as mesmas condições. São tiradas fotografias da área corada de 32 mm, que são analisadas utilizando Image-Pro Plus 6 (Media Cybernetics, Inc., MD).

Os dados de uma experiência representativa, para anticorpos a 50 µg/ml, são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15

Efeito dos Anticorpos C8 na Morfogénese Tubular em Células HepG2							
Anticorpo (50 µg/ml)	hlgG4	C8-H241	C8-co16	C8-6	mIgG	5D5	NGF (50 ng/ml)
Morfogénese tubular	nenhuma estimulação	nenhuma estimulação	nenhuma estimulação	1,2	1,2	4,9	5,4
Atividade agonista							
(vezes de estimulação)							

Estes dados demonstram que HGF e o anticorpo agonista de controlo 5D5 induzem alterações morfogénicas tubulares de aproximadamente 5 vezes em células HepG2 em comparação com o controlo do isotipo. Em contraste, os presentes anticorpos de c-Met C8-H241 e C8-col6 não induzem alterações morfogénicas tubulares significativas em células HepG2 sob as mesmas condições, enquanto o anticorpo de c-Met C8-6 induz apenas um baixo nível de estimulação.

Resultados semelhantes são obtidos com o mAb D11-8-B8.

Exemplo 14

Efeito dos Anticorpos na Motilidade Celular: Ensaio de Dispersão de DU145 e Ensaio de Risco em Células H441

Após estimulação com HGF, células de cancro da próstata DU145 dissociam-se uma das outras e células H441 preenchem um risco feito numa camada de células confluentes. As células H441 exibem um elevado nível de expressão de c-Met e fosforilação constitutiva deste recetor, mas ainda respondem a HGF. As experiências seguintes avaliam o efeito agonista dos anticorpos do presente invento na motilidade celular num ensaio de dispersão e num ensaio de risco.

Ensaio de Dispersão de Células DU145

Células DU145 (ATCC, # HTB-81) cultivadas em meio MEM (Invitrogen, #11095) + FBS a 10% (Invitrogen, #10082) a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v) são plaqueadas a 2×10³ células/poço em 70 µl de volume em placas de 96 poços ViewPlate negras (Perkin Elmer, Waltham, MA, #6005182) e incubadas de um dia para o outro a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). Os anticorpos de c-Met e de controlo são diluídos em meio de cultura de células e adicionados a uma concentração final de 20 µg/ml, e o HGF é adicionado a uma concentração final de 20 ng/ml, cada num volume de 30 µl com doze replicados, e incubados durante 48 horas a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). O meio é então aspirado e as células são fixadas em formaldeído a 2% durante 15 min. à temperatura ambiente. Os poços são lavados três vezes com PBS, e são adicionados 50 µl de faloidina Alexa Fluor 488 a 5 U/ml (Invitrogen, #A12379) durante 30 min. à temperatura ambiente. Os poços são lavados três vezes com PBS e são adicionados 50 µl de iodeto de propídio 15 µM (Invitrogen, #P3566). A placa é subsequentemente lida num citómetro de microplacas de fluorescência de varrimento laser Acumen Explorador™ (TTP Labtech ltd., Cambridge, MA) utilizando suporte lógico Jockyss para determinar a percentagem de células DU145 nas colónias.

Os resultados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16

Efeito dos Anticorpos C8 e D11 na Dispersão de Células DU145									
	Porcentagem de Células DU145 nas Colônias								
	C8-H241	C8-6	C8-co-16	hIgG4	D11-8B8	hIgG2	5D5	HGF	Não tratado
Média	24,13	23,29	23,69	24,41	25,57	25,67	14,45	8,15	26,53
Desv. Pad.	3,35	1,37	2,30	2,02	1,98	3,13	0,34	1,23	2,44

Os dados demonstram que o mAb de c-Met agonista 5D5 e HGF, mas não os mAb de c-Met C8-H241, C8-co-16, C8-6, ou D11-8B8, estimulam significativamente a dispersão/motilidade de células DU145.

Ensaio de Risco de Células H441

Para o ensaio de Risco de H441, células H441 (ATCC, # HTB-174) são cultivadas em RPMI-1640 (Invitrogen, #11835); FBS a 10% (v/v) (Invitrogen, #10082); L-glutamina 2 mM (Invitrogen, #25030); penicilina G a 100 U/500 ml, e estreptomicina a 100 µg/500 ml (Invitrogen, # 15140), e semeadas a 1×10^6 células/2 ml/poço em placas de cultura de tecidos de 6 poços (Costar, #3598) no meio de cultura. As placas são incubadas durante 3 dias sob 95% de humidade relativa e CO₂ a 5% (v/v). O meio é então aspirado, e as células são privadas de nutrientes em meio pobre em soro (FBS a 0,5% (v/v) em meio RPMI) durante 16 horas. As camadas de células confluentes no fundo dos poços são riscadas com pontas de pipetas de 5 ml no meio de cada poço, e as células a flutuar são aspiradas. As restantes células são lavadas 1× com meio pobre em soro. Meio pobre

em soro é adicionado, e as áreas riscadas são visualizados utilizando um microscópio de campo claro com uma objetiva de 4x. Estes intervalos são definidos como Intervalos às 0 horas.

Os anticorpos de teste são adicionados às células a uma concentração final de 10 µg/ml, seguido de incubação a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v) durante 16 horas. HGF é testado a uma concentração final de 200 ng/ml. Cada grupo de tratamento é testado pelo menos em poços em duplicado. As áreas riscadas são novamente visualizadas usando um microscópio de campo claro às 16 horas. Estes intervalos são definidos como Intervalos às 16 horas.

O efeito dos anticorpos de c-Met ou HGF no movimento das células H441 para preencher os intervalos é calculado da seguinte forma:

$$\text{Percentagem de alteração média} = \frac{\text{Grupo de tratamento (Intervalo às 0 horas - Intervalo às 16 horas)}}{\text{Grupo de meio médio (Intervalo às 0 horas - Intervalo às 16 horas)}} \times 100$$

Os resultados são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17

Efeito dos anticorpos C8 no Ensaio de Risco de H441		
Anticorpo (10 µg/ml)	% Méd.	Desv. Padr.
Meio	100	7
hIgG4	98	9

(continuação)

Efeito dos anticorpos C8 no Ensaio de Risco de H441		
Anticorpo (10 µg/ml)	% Méd.	Desv. Padr.
C8-H241	98	9
C8-6	102	4
mIgG1	98	18
mAb 5D5	244	4
HGF (200 ng/ml)	364	9

Os dados demonstram que o mAb agonista de c-Met 5D5 e HGF estimulam o movimento de células H441/preenchimento das áreas riscadas. Sob as mesmas condições, os mAb de c-Met C8-H241 e C8-6 não estimulam a motilidade das células H441.

Exemplo 15

Efeito dos Anticorpos de c-Met na Capacidade de Invasão de Células HepG2

HGF e anticorpos de c-Met agonistas estimulam a invasão de células portadoras de c-Met. Este exemplo examina a atividade agonista dos presentes anticorpos de c-Met num ensaio de invasão celular empregando células HepG2, que respondem a HGF num ensaio de invasão.

Células HepG2 (ATCC, #H-8065) são privadas de nutrientes de um dia para o outro em meio MEM isento de

soro (Invitrogen, #11095) e depois 5×10^4 células num volume total de 500 μ l são adicionados a cada poço da câmara superior de uma câmara de invasão de Matrigel (BD, Franklin Lakes, NJ, #354483), com a câmara inferior contendo os anticorpos num volume total de 750 μ l de meio isento de soro a uma concentração de 10 μ g/ml, ou HGF a 50 ng/ml em meio isento de soro, seguido por incubação durante quarenta e oito horas a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). As células não invasoras são removidas da câmara superior com uma zaragatoa, seguido por fixação da membrana com etanol a 95% e coloração com violeta cristal a 0,2% (p/v). Após lavagem e secagem, o número de células invasoras é contado utilizando análise por suporte lógico Image-Pro Plus 6 Manual Tag (Media Cybernetics, Inc., MD) das fotografias tiradas de células coradas com uma objetiva de 2,5 \times .

Os resultados são resumidos na Tabela 18.

Tabela 18

Efeito dos Anticorpos C8-, C8, e D11 na Capacidade de Invasão de Células HepG2								
Concentração de Anticorpo (μ g/ml)	Número Médio de Células por Campo de 2,5 \times							
	hIgG4	C8-H241	C8	mIgG1	optD11	5D5	HGF (50 ng/ml)	Meio
10.00	5,5	3,5	4,3	5,5	19,8	85,0	509,5	3,5
	Err. Pad.							
	0,5	0,9	1,3	0,5	4,1	20,4	4,5	0,5

Os dados demonstram que o mAb de c-Met agonista 5D5 e HGF, mas não os mAb de c-Met C8-H241 e C8 (de murídeo), estimulam a invasão de HepG2. O mAb de c-Met de murídeo optD11 induz invasão de células HepG2.

Exemplo 16

Os Anticorpos C8 e D11 Não Protegem Células Caki-1 de Apoptose Induzida por Estaurosporina

HGF e anticorpos de c-Met agonistas protegem células da morte celular induzida por estaurosporina. Este exemplo examina a atividade agonista dos anticorpos de c-Met do presente invento num ensaio de apoptose induzida por estaurosporina empregando células Caki-1 que respondem a HGF.

As células Caki-1 (ATCC, #HTB-46) são cultivadas tal como descrito no Exemplo 11, semeadas a 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços (Costar, #3596) em meio de cultura, e pré-tratadas com anticorpos (diluídos de 30000 ng/ml para 3 ng/ml no meio de cultura de células), ou HGF (diluído de 225 ng/ml para 0,02 ng/ml), durante uma hora seguido de tratamento com estaurosporina 0,1 μ M (concentração final) durante quarenta e oito horas a 37°C. O meio é aspirado e as células são lisadas durante 30 min. com 0,2 ml do componente tampão de lise do estojo Cell

Death Detection ELISA (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, #11774425001). Este estojo utiliza 20 µl de cada lisado para medir a morte celular através de detecção de fragmentos de ADN associados a histonas citoplasmáticas tal como determinado pela absorção a 450 nm. Uma densidade ótica mais elevada a 450 nm indica maior apoptose.

Os resultados mostrados na Tabela 19 demonstram que HGF, mas não os mAb de c-Met C8-H241, C8-6, e D11-8B8, protege células Caki-1 de apoptose induzida por estaurosporina.

Tabela 19

Efeito dos Anticorpos de c-Met em Apoptose Induzida por Estaurosporina em Células Caki-1								
Dose de anti-corpo (ng/mL)	Média A450 nm							
	hIgG4	C8-H241	C8-6	HGF	hIgG2	D11-8B8	Meio	STS*
3	0,95	0,83	1,09	0,97 (0,02 ng/mL)	0,95	1,02	0,24	0,87
30	0,98	0,84	1,02	0,93 (0,23 ng/mL)	0,91	0,91		
300	0,87	0,86	0,97	0,73 (2,25 ng/mL)	0,95	0,81		
3000	0,98	0,85	0,92	0,58 (22,5 ng/mL)	0,95	0,91		
30000	0,91	0,90	0,96	0,45 (225 ng/mL)	0,94	0,87		
	ErrPAD.							
3	0,03	0,02	0,19	0,02	0,07	0,01	0,01	0,03
30	0,03	0,01	0,14	0,06	0,00	0,11		
300	0,10	0,03	0,06	0,03	0,02	0,02		
3000	0,04	0,01	0,12	0,01	0,06	0,02		
30000	0,00	0,01	0,13	0,06	0,04	0,03		

*STS: Estaurosporina

Exemplo 17**Efeito de Anticorpos C8- na Angiogênese**

HGF e anticorpos de c-Met agonistas estimulam a angiogênese. Os anticorpos de c-Met do presente invento são avaliados quanto a estas propriedades funcionais agonistas no ensaio de formação de tubos em co-cultura de ADSC/ECFC. Células estaminais derivadas de adiposo (ADSC) expressam HGF; as células formadoras de colônias endoteliais (ECFC) formam tubos em resposta à estimulação por HGF.

ADCS (Lonza, Allendale, NJ, #PCT-5006) são dissociadas, ressuspensas em meio basal (meio MCDB-131 (Sigma, St. Louis, MO #M8537)) + 2-fosfato de ácido L-ascórbico a 30 µg/ml (Sigma #A8960), dexametasona 1 µM (Sigma #D4902), tobramicina a 50 µg/ml (Sigma #T4014), r-transferrina Cell Prime AF a 10 µg/ml (Millipore #9701) + Nucellin a 10 µg/ml (insulina recombinante humana de Lilly), plaqueadas a 4×10^4 células/poço em placas de 96 poços, e incubou-se de um dia para o outro a 37°C sob CO₂ a 5% (v/v). O meio é aspirado e heparina sódica a 500 µg/ml (Sigma, #H3393) é adicionada em meio basal a 100 µl/poço; as células são então incubadas durante 1 hora a 37°C. Os poços são aspirados, lavados uma vez com 100 µl de meio basal, e são adicionadas ECFC como se segue: ECFC (EndGenitor

Technologies, Inc., Indianapolis, IN #EGT-ECFC100506) são dissociadas, lavadas em meio basal, ressuspensas em meio basal, e adicionadas a 4×10^3 células/poço sobre ADSC em placas de 96 poços. Após 4 horas de incubação a 37°C, HGF e os anticorpos são diluídos no meio de cultura de células e adicionados a poços separados nas seguintes concentrações finais: HGF: 100 ng/ml; anticorpos: 10 µg/ml. O anticorpo de HGF (R&D Systems #AB-294-NA) é também adicionado à concentração final de 10 µg/ml. As células são incubadas durante mais 4 dias a 37°C. Os poços são aspirados, e são adicionados 100 µl/poço de paraformaldeído a 1%, seguido de incubação durante 20-30 min. As células são lavadas três vezes com PBS-BSA (BSA a 0,1%, Invitrogen #15260-037) e tratadas com 50 µl de anticorpo anti-CD31 humano a 1 µg/ml (R&D Systems, #AF806) durante 1 hora a 37°C ou de um dia para o outro a 4°C. As células são lavadas duas vezes com PBS-BSA e tratadas com 50 µl de anti-IgG de ovelha conjugado com AlexaFluor488 a 4 µg/ml (Invitrogen, #A11015) durante 1 hora à temperatura ambiente. As células são lavadas duas vezes com PBS-BSA e coradas com 100 µl de corante Hoechst33342 e lidas num Cellomics ArrayScan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). O suporte lógico vHCS View Versão 1.4.6 é utilizado para determinar as áreas totais de tubos, que são utilizadas para avaliar o efeito dos vários anticorpos e de HGF na estimulação de angiogénese.

Os resultados são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20

Efeito de Anticorpos C8- na Formação de Tubos em Células ECFC								
Área Total de Tubos								
	Maio Basal	hIgG4	C8-H241	C8-6	mIgG1	5D5	Ab HGF	HGF
Méd.	67753,3	90134,3	22979,7	65224,0	125538,3	147237,3	22824,3	212104,7
Desv. Pad.	24221,6	17741,1	604,9	18275,9	34702,4	18748,1	6586,0	16588,5

Os resultados demonstram que C8-H241 e C8-6 não estimulam a formação de tubos em comparação com o meio ou os seus correspondentes anticorpos de controlo do isotipo, enquanto HGF e o mAb agonista 5D5 estimulam significativamente a formação de tubos.

Exemplo 18

Inibição do Crescimento de Células Tumorais Independentes de HGF e Dependentes de HGF em Modelos de Xenoenxerto

A inibição do crescimento de células tumorais independentes de HGF e dependentes de HGF através de anticorpos de c-Met do presente invento é examinada em ensaios *in vivo* empregando modelos de xenoenxerto de ratinho de células MKN45 e U87MG (glioblastoma humano), respetivamente. As células MKN45 expressam constitutivamente níveis elevados de c-Met e fosforilação de c-Met na ausência de HGF. As células U87MG segregam HGF de um modo autócrino, e respondem a HGF.

Células MKN45 (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resource, #JCRB0254) são expandidas

em cultura tal como descrito no Exemplo 8, tripsinizadas para células individuais, colhidas e ressuspensas em PBS. Dois milhões de células MKN45 em PBS são injetados por via subcutânea no flanco traseiro de ratinhos nus atímicos (Harlan, Indianapolis, IN). Anticorpos de c-Met e correspondentes anticorpos IgG2 e IgG4 são diluídos em PBS, pH 7,2, e administrados numa base semanal através de injeção intravenosa começando a partir dos 3 ou 7 dias após a implantação de células tumorais a 1, 5, ou 20 mg/ml. A inibição do crescimento de células tumorais é determinada através da medição tridimensional com paquímetro dos volumes tumorais duas vezes por semana durante o curso do tratamento. O peso corporal é medido como uma medida geral da toxicidade.

Células U87MG (ATCC, #HTB-14) são cultivadas em MEM (Invitrogen, #11095) a 37°C, expandidas em cultura, tripsinizadas para células individuais, colhidas, e ressuspensas em PBS (Invitrogen, # 14190). Cinco milhões de células são injetados por via subcutânea no flanco traseiro de ratinhos nus atímicos (Harlan, Indianapolis, IN). Os anticorpos de c-Met são diluídos em PBS, e administrados numa base semanal através de injeção intravenosa nas doses indicadas na Tabela 22 começando 7 dias após a implantação das células tumorais. O anticorpo de controlo IgG4 é administrado a 10 mg/kg. A inibição do crescimento de células tumorais é determinada através da medição tridimensional com paquímetro dos volumes tumorais duas vezes por semana durante o curso de tratamento. O peso corporal é medido como medição geral da toxicidade.

A eficácia antitumoral de quatro anticorpos, D11-8B8, C8-H241, C8-6, e C8-Co-16 no modelo de xenoenxerto de células MKN45 está resumida na Tabela 21. A "% máxima de inibição" representa a percentagem de inibição do crescimento tumoral em comparação com o tratamento com o anticorpo de controlo correspondente (0% de inibição).

Quando administrados em doses de 5 mg/kg ou 20 mg/kg, todos os quatro anticorpos de c-Met produzem uma inibição significativa do crescimento de células tumorais MKN45 em comparação com os seus correspondentes controlos de isotipo de IgG.

Tabela 21

Efeito de Anticorpos C8- e D11- no Crescimento <i>In Vivo</i> de Tumores MKN45 Independentes de HGF			
Anticorpo	Nível de dose (mg/kg)	% Máxima de Inibição	Valor de p
D11-8B8	5	53	p<0,05
	20	56	p<0,01
C8-H241	1	39	NS
	5	63	p<0,01
	20	51	p<0,05
C8-6	1	60	p<0,001
	5	59	p<0,01
	20	73	p<0,001
C8-Co-16	1	36	NS
	5	60	p<0,001
	20	85	p<0,001

Uma inibição dependente da dose do crescimento de células tumorais através de C8-H241 é também observada no modelo de xenoenxerto de células U87MG dependentes de HGF, tal como resumido na Tabela 22. A "% Máxima de Inibição" representa a percentagem de inibição do crescimento tumoral em comparação com o tratamento com o correspondente anticorpo de controlo IgG4 (0% de inibição).

Tabela 22

Efeito do Anticorpo C8-H241 no Crescimento <i>In Vivo</i> do Tumor U87MG Dependente de HGF			
Anticorpo	Nível de dose (mg/kg)	% Máxima de Inibição	Valor de p
C8-H241	0,1	45,2	NS
C8-H241	0,3	86,8	p<0,001
C8-H241	1	91,9	p<0,001
C8-H241	3	91	p<0,001
C8-H241	10	94,8	p<0,001

A 5 e 20 mg/kg, o anticorpo C8-H241 também inibe o crescimento do tumor de xenoenxerto de cancro do pulmão de células não pequenas H441 a 58% e 60%, respetivamente. As células H441 exibem um elevado nível de expressão de c-Met e fosforilação constitutiva de c-Met, mas respondem ainda a HGF.

Exemplo 19**Redução por Anticorpos do c-Met Total e Fosforilado em Tumores de Xenoenxerto MKN45**

A atividade *in vivo* do anticorpo de c-Met C8-H241 no c-Met total e no c-Met fosforilado em ratinhos possuindo tumores de xenoenxerto MKN45 (independente de HGF) é investigada neste exemplo. Uma redução dependente da dose tanto do c-Met total como do c-Met fosforilado (na tirosina 1349) é observada 24 horas após a administração do anticorpo.

Células MKN45 são expandidas em cultura tal como descrito no Exemplo 8, tripsinizadas, e colhidas. Dois milhões de células MKN45 em PBS são injetados subcutaneamente no flanco traseiro de ratinhos nus atímicos (Harlan, Indianapolis, IN). O anticorpo de c-Met C8-H241 é diluído em PBS, pH 7,2, e administrado através de injeção intravenosa oito dias após o implante das células tumorais a 2,5, 5, 10, 20, e 40 mg/kg. O anticorpo de controlo hIgG4 é administrado a 40 mg/kg. Após 24 horas de tratamento, os tumores são removidos, rapidamente congelados, armazenados temporariamente a -80°C, e lisados em tampão de lise (ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, ácido etilenoglicol-bis(b-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 5 mM, HEPES 50 mM, pirofosfato de sódio 20 mM (ThermoFisherScien-

tific, #S390-500), NaCl 150 mM, NaF 20 mM, octilfenoxi-polietoxi-etanol (TRITON®-X 100) a 1% (v/v), inibidor completo de proteases, livre de EDTA (Roche, Basel, Suíça, #1836153), mistura I de inibidores de fosfatases (Sigma #P2850), e mistura II de inibidores de fosfatases (Sigma #P5726)).

ELISA de c-Met Total

Para o ELISA de c-Met total, um anticorpo de captura de c-Met é diluído em tampão de revestimento Bup H (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, #28382) a 2 µg/ml. 100 µl do anticorpo diluído são adicionados por poço às placas de ELISA (ThermoFisherScientific, Waltham, MA #439454), e as placas são incubadas de um dia para o outro a 4°C. Os poços são aspirados, lavados duas vezes com TBS-T, e depois bloqueados com 200 µl de tampão de bloqueio (TBS-T mais BSA a 2% (p/v)) durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas são lavadas duas vezes com TBS-T. Em seguida, são adicionadas diluições de lisados de tumor ou domínio extracelular de c-Met (aminoácidos 25-932 de SEQ ID NO: 75), e as placas são incubadas de um dia para o outro a 4°C. As placas são então lavadas três vezes com TBS-T. 100 µl de 0,5 µg/ml de mAb 5D5 biotinilado (como segundo anticorpo de c-Met que se liga a um epitopo de c-Met diferente do anticorpo de captura) diluído em tampão de bloqueio são então adicionados a cada poço, e as placas são

incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas são lavadas três vezes com TBS-T. 100 µl de estreptavidina conjugada com peroxidase diluída 1/10000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, #016-030-484) em tampão de bloqueio são então adicionados, e a mistura é incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas são então lavadas três vezes com TBS-T. 100 µl de solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BioFX, #TMBW-1000-01) são adicionados a cada poço, seguido pela adição de 100 µl de solução de paragem (BioFX, #LSTP-1000-01). As placas são lidas a 450 nm utilizando um leitor de placas SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com suporte lógico SOFTmax Pro 3.1.2 (Molecular Devices).

ELISA de c-Met Fosforilado

Para o ELISA de fosfo-c-Met, um anticorpo de captura de c-Met é diluído em tampão de revestimento Bup H (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, #28382) a 2 µg/ml. 100 µl do anticorpo diluído são adicionados por poço às placas de ELISA (ThermoFisherScientific, Waltham, MA #439454), e as placas são incubadas de um dia para o outro a 4°C. Os poços são aspirados, lavados duas vezes com TBS-T, e depois bloqueados com 200 µl de tampão de bloqueio (TBS-T mais BSA a 2% (p/v)) durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas são lavadas duas vezes com TBS-T. Em seguida, são adicionados lisados de células MKN45, e as

placas são incubadas de um dia para o outro à temperatura ambiente. As placas são então lavadas três vezes com TBS-T. 100 µl de anticorpo de c-Met anti-pY1349 a 0,5 µg/ml (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, #3121) diluído em tampão de bloqueio são então adicionados a cada poço, e as placas são incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas são lavadas três vezes com TBS-T. 100 µl de anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase diluído 1/10000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, #111-035-144) em tampão de bloqueio são então adicionados, e a mistura é incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas são então lavadas três vezes com TBS-T. 100 µl de solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BioFX, #TMBW-1000-01) são adicionados a cada poço, seguido pela adição de 100 µl de solução de paragem (BioFX, #LSTP-1000-01). As placas são lidas a 450 nm utilizando um leitor de placas SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com suporte lógico SOFTmax Pro 3.1.2 (Molecular Devices).

Os resultados são mostrados na Tabela 23.

Os dados demonstram que o tratamento *in vivo* de tumores de xenoenxerto de MKN45 com mAb C8-H241 durante 24 horas reduz de forma máxima o c-Met total em aproximadamente 43%, e o c-Met fosforilado em aproximadamente 73%, sob estas condições.

Tabela 23

Redução do c-Met Total e Fosforilado em Tumores de Xenoinxerto de MKN45 Após 24 Horas de Tratamento com Anticorpo de c-Met C8-H241 <i>in vivo</i>							
Redução do c-Met Total							
% de inibição		C8-H241					hIgG4
	PBS	2,5 mpk	5 mpk	10 mpk	20 mpk	40 mpk	40 mpk
% média de inibição	-88,51	-8,43	4,26	25,07	42,85	30,62	0,00
desv. padr. da % de inibição	62,63	-8,43	36,84	26,88	17,67	35,95	41,23
Redução do c-Met Fosforilado							
% de inibição		C8-H241					hIgG4
	PBS	2,5 mpk	5 mpk	10 mpk	20 mpk	40 mpk	40 mpk
% média de inibição	12,16	22,89	17,56	53,21	67,04	73,42	0,00
desv. padr. da % de inibição	23,89	22,89	37,05	9,90	6,58	7,04	48,81

mpk: mg/kg

Sequências de Aminoácidos e Nucleótidos

Sequências de Aminoácidos de Região Variável de Cadeia Leve

D11-S17Y (SEQ ID NO: 1)

FIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
GIPDRFSGSGSGFDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGKLEIK

D11-8B8 (SEQ ID NO: 2)

FIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
GIPDRFSGSGSGFDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGKLEIK

D11-C27G3 (SEQ ID NO: 3)

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATLSCSVSSSSISSTNLHWYQQKPGQAP~~RLL~~YGTSRLRS
GIPDRFSGSGSGTDFTLT~~IS~~RLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIK

C8-6 (SEQ ID NO: 4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLL~~I~~YSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLT~~ISS~~LQPEDFATYYCIQYSGYPLTFGGGKVEIK

C8-H241 (SEQ ID NO: 5)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLL~~I~~YSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLT~~ISS~~LQPEDFATYYCQVYSGYPLTFGGGKVEIK

C8-co-16 (SEQ ID NO: 6)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVRSIYLHWYQQKPGKAPKLL~~I~~YSTSNLA
SGVPSRFSGSGSGTDFTLT~~ISS~~LQPEDFATYYCQVYRGYPLTFGGGKVEIK

Sequências de Ácido Nucleico de Região Variável de Cadeia
Leve

D11-S17Y (SEQ ID NO: 7)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCGTGCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTGAGCTCAAGTATAAGTTCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTATCTGGCTTCTGGCATCCCA
GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAA

D11-8B8 (SEQ ID NO: 8)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTACCTGGCTTCTGGCATCCCA
GACAGGFTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAA

D11-C27G3 (SEQ ID NO: 9)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCAGACTGAGATCTGGCATCCCA
GACAGGFTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAA

C8-6 (SEQ ID NO: 10)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCCATTTACTTGCCTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGFTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTATTACAGTACAGTGGTTACCCGCTCACGTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

C8-H241 (SEQ ID NO: 11)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCCATTTACTTGCCTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGFTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTACAGGTGTACAGTGGTTACCCGCTCACGTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

PE2358755

- 121 -

C8-co-16 (SEQ ID NO: 12)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAGTGTCAAGTGTACGTTCCATTTACTTGCCTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTFCAGGTGTACAGGGGTTACCCGCTCACGTTCCGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Sequências de Aminoácidos de Região Variável de Cadeia
Pesada

D11-S17Y (SEQ ID NO: 13)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRVYHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTFYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYW
QGTLVTVS

D11-8B8 (SEQ ID NO: 14)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRVYHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYIEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYWG
QGTLVTVS

D11-C27G3 (SEQ ID NO: 15)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRVYHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYREPFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYWG
QGTLVTVS

C8-6 (SEQ ID NO: 16)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHVVRQAPGQGLEWMGRV
NPNRGGTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTNWL
WGQGTITVTVS

C8-H241 (SEQ ID NO: 17)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPNRRGTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARANWLDY
WGQGTFTVTS

C8-co-16 (SEQ ID NO: 18)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPYRGSTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARANILDYW
GQGTFTVTS

**Sequências de Ácido Nucleico de Região Variável de Cadeia
Pesada**

D11-S17T (SEQ ID NO: 19)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAACTGGTGATACTTACTAC
AACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAC
GGAGCTTTTTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAACCGTCTCC

D11-8B8 (SEQ ID NO: 20)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAACTGGTGATACTTACTAC
ATCGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
GGTGCTTTTTTCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAACCGTCTCC

D11-C27G3 (SEQ ID NO: 21)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAACCTGGTGAFACCTACTAC
AGAGAGCCTTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
GGGGCTTTTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCC

C8-6 (SEQ ID NO: 22)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCGACTACTACATGCACCTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTCGTGTTAATCCTAACC GGGGTGGTACTACCTAC
AACCAGAAATTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGECTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTACGAAC
TGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCGTCACCGTCTCC

C8-H241 (SEQ ID NO: 23)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCGACTACTACATGCACCTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTCGTGTTAATCCTAACC GGAGGGTACTACCTAC
AACCAGAAATTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTACGAAC
TGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCGTCACCGTCTCC

C8-co-16 (SEQ ID NO: 24)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACATTCACTGACTACTACATGCACCTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTCGTGTTAATCCTTATCGGGSTAGTACTACCTAC
AACCAGAAATTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTACGAAC
ATCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCGTCACCGTCTCC

Sequências de Aminoácidos de Cadeia Leve Completa

Capa de D11-S17Y (SEQ ID NO: 25)

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLA
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Capa de D11-8B8 (SEQ ID NO: 26)

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLA
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Capa de D11-C27G3 (SEQ ID NO: 27)

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSRLRS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Capa de C8-6 (SEQ ID NO: 28)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCIQYSGYPLTFGGGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Capa de C8-h241 (SEQ ID NO: 29)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVYSGYPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Capa de C8-co-16 (SEQ ID NO: 30)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCSVSSVRSIYLHWYQQKPKAPKLLIYSTSNLA
 SGVPSRFRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVYRQYPLTFGGGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sequências de Ácido Nucleico de Cadeia Leve Completa

LC de D11-S17Y (SEQ ID NO: 31)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGTGTCCAGCTCAAGTATAAGTTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
 CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTACCTGGCTTCTGGCATCCCA
 GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
 CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAAAGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCG
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCCAAGTCACCCATCAG
 GGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

LC de D11-8B8 (SEQ ID NO: 32)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGTGTCCAGCTCAAGTATAAGTTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
 CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTACCTGGCTTCTGGCATCCCA
 GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
 CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAAAGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCG
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCCAAGTCACCCATCAG
 GGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

LC de D11-C27G3 (SEQ ID NO: 33)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCAACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTGAGCTCAAGTATAAGTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCAGACTGAGATCTGGCATCCCA
GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCCGGC
CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

LC de C8-6 (SEQ ID NO: 34)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAGTGTGAGCTCAAGTGTAAAGTCCATTTACTTGCCTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTATTCAAGTACAGTGGTTACCCGCTCAGGTTCCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

LC de C8-H241 (SEQ ID NO: 35)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAGTGTGAGCTCAAGTGTATCCTCCATTTACTTGCCTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAGTCTACAGTGGTTACCCGCTCAGGTTCCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

LC de C8-co16 (SEQ ID NO: 36)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAGTGTGAGCTCAAGTGTACGTTCCATTTACTTGCCTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAGTGTACAGGTTACCCGCTCAGGTTCCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

Sequências de Aminoácidos de Cadeia Pesada Completa

IgG2 D11-S17Y (SEQ ID NO: 37)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRVYHWVRQAPGGGLEWMGWIYP
VTGDTYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYGAFYYW
GGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVR
KCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

IgG2 D11-8B8 (SEQ ID NO: 38)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRVYHWVRQAPGGGLEWMGWIYP
VTGDTYYIEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYGAFYYWG
GGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVR
KCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

IgG2 D11-C27G3 (SEQ ID NO: 39)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRVYHWVRQAPGGGLEWMGWIYP
VTGDTYYREPFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYGAFYYWG
GGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVR
KCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

IgG2 C8-6 (SEQ ID NO: 40)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWRQAPGGLEWMGRV
NPNRRGGTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTNWLDY
WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE
RKCCVECFPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

IgG2 C8-H241 (SEQ ID NO: 41)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWRQAPGGLEWMGRV
NPNRRGGTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARANWLDY
WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE
RKCCVECFPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

IgG2 C8-co-16 (SEQ ID NO: 42)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWRQAPGGLEWMGRV
NPYRGSTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARANILDYW
GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECFPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT
OKSLSLSPG

Sequências de Ácido Nucleico de Cadeia Pesada Completa

HC de IgG2 D11-S17Y (SEQ ID NO: 43)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGGGACAGGCC
 CCTGGACAAGGGCTTGACTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAACCTGGTGATACTTACTAC
 AACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
 GGGGCTTTTTACTACTGGGGCCAGGCCACCCTGGTCACCGTCTCCTCCGCCCTCCACCAAG
 GGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCCCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC
 GCCCTGACCAGCCGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCCACAGTCCACAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCCTGGTGACCGTGGCCCTCCAGCAACTTCGSCACCCAGACCTACACCTGCAAC
 GTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC
 GAGTGCCCAACCGTGCCCAAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
 AAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACCGTGGCTGGTGGTGGAC
 GTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC
 CTCACCGTCTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCCTG
 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAAGCGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
 GGT

HC de IgG2 D11-8B8 (SEQ ID NO: 44)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGGGACAGGCC
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAACCTGGTGATACTTACTAC
 ATCGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
 GGTGCTTTTTTCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCCGCCCTCCACCAAG
 GGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCCCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC
 GCCCTGACCAGCCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCCTGGTGACCGTGGCCCTCCAGCAACTTCGSCACCCAGACCTACACCTGCAAC
 GTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC
 GAGTGCCCAACCGTGCCCAAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
 AAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACCGTGGCTGGTGGTGGAC
 GTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC
 CTCACCGTCTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCCTG
 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAAGCGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
 GGT

HC de IgG2 D11-C27G3 (SEQ ID NO: 45)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAACCTGGTGATACTTACTAC
AGAGAGCCTTTCAAGGGCAGAGTCAAGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGGCTAC
GGAGCFTTTTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCCGCCCTCCACCAAG
GGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCSCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAAC
GTAGATCAAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC
GAGTGCCACCCGTGCCCAGCACCCCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAAGCTC
CTCACCGTCTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAAGCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACCTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
GGT

HC de IgG4 C8-6 (SEQ ID NO: 46)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTCACACCTTTACCGACTACTACATGCCTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTCTGTGTTAATCCTAACCGGGTGGTACTACCTAC
AACCAGAAATTCGAGGGCCGFGTCAACATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTCTGACGACACGGCCGTGATTACTGTGCGCGTACGAAC
TGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCGTCAACCGTCTCCTCCGCCCTCCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTG
GGCTGCCTGGTCAAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGAACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCAAGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA
TGCCACCCCTGCCAGCACTGAGGCGCGGGGACCATCAGTCTTCTCTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGAC
GTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTACCSTGTGGTCAAGCTC
CTCACCGTCTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAG
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAAGCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
GGT

HC de IgG4 C8-H241 (SEQ ID NO: 47)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACATTCAGTACTACTACATGCACCTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGCTGTTAATCCTAACCGGAGGGGTACTACTAC
AACCAGAAATTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTGCGAAC
TGGCTTACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTACCGTCTCCTCCGCCCTCCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTG
GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA
TGCCACCCCTGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCA
AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGAC
GTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCCGGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTACCGTGTGGTGCAGCGT
CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG
CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
GGT

HC de IgG4 C8-co16 (SEQ ID NO: 48)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACATTCAGTACTACTACATGCACCTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGCTGTTAATCCTTATCGGGGTAGTACTACTAC
AACCAGAAATTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTGCGAAC
ATTCTTACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTACCGTCTCCTCCGCCCTCCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTG
GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA
TGCCACCCCTGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCA
AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGAC
GTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCCGGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTACCGTGTGGTGCAGCGT
CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG
CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
GGT

cMet Humano-ECD-Fc-Flis (SEQ ID NO: 72)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQN
VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSG
GVWKDNINMALVVDTYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFS
PQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNNTINSSYFPDHPPLHSISVRRLK
ETKDGFMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFESNNFTYFLTVQRETLDAQTFHT
RIRFCSTNSGLHSYMEMPLECILTERRKRRSTKKEVFNILQAAAYVSKPGAQLARQI
GASLNDLILGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAF?IKYVNDFFNKIVNKNNVRLQ
HFYGPNIHFHCINRILLRNSSGGEARRDEYRTEFTTALQRVDLIMGQFSEVLLTSTI
STFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVVSPEVIVEHTLNQ
NGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAAPPVQCGWCHDKCVRSEECLS
GTWTQQICLPAIYKVPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE
SCTLTLSESTMNTLTKCTVGPAMNKHFNMSHISNGHGTTQYSTFSYVDPVIT'SISPK
YQPMAGGTLLTITGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSHLCYTPAQTISTEFA
VKLIKIDLANRETSIFSYPREDPIVYEHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINV
HEAGRNETVACQHRNSSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLTY
VHNPVFKPFKPYMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKNSCENIHLHSE
AVLCTVPNDLLKLNSEFINIEWKQAISSTVLGKVIVQFDQNFLEVLFGQPDIEPKS
CDKTHTCPPCPAPEILGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIIQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPEKTIKAKGQPREPQEYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSIFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNY
*TQKSLSLSPGKR**LDYKDDDDKHVHHHHH***

Os aminoácidos a negrito e em itálico representam a sequência sinal; os aminoácidos a negrito e sublinhados representam a etiqueta Flis.

c-Met de Macaco Cinomolgo-ECD-Fc-Flis (SEQ ID NO: 73)

MKAPAVLVPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETAIQN
VILHEHHJFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSG
GVWKDNINMALVVDIYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFS
PQIEFPNQCPCDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNJINSSYFPHHPLHSISVRLK
ETKDGFMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYIHAFESNNFIYFLTVQIRETLNAQTFHTR
IIFCSSLNSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAVYSKPGAQLARQI
GASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPJKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQ
HFYGPNEHEHCENRILLRNSSGCEARRDEYRAEFTTAIQRVDFMGQFSEVLLTSI
STFVKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFILDSHPVSPVIVFHPINQ
NGYTLVVTGKKJTKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECPS
GTWTQQICLPAIYKVFPTSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE
SCTLTLSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNMSHHSNGHGTTQYSTFSYVDPITISPK
YGPMAGGTLTTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFA
VKLKIDLANRETSIFSYPYREDPIVYIEHPTKSFISGGSTTGVGKNLHSSVPRMVINV
HEAGRNFVACQHRNSNEIHCCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIY
VHNPVFKPFKFPVMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKNKSCENIHLHSE
AVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFTEVLVFGQPDIEPKS
CDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQEYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKRIDYKDDDDKHVHHHHHH

Os aminoácidos a negrito e em itálico representam a sequência sinal; os aminoácidos a negrito e sublinhados representam a etiqueta Flis.

c-Met de Rato-ECD-Fc-Flis (SEQ ID NO: 74)

MKAPTALAPGILLLLLLTLAQRSHGECKEALVKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIHN
 VVLHGHHIYL GATNYIYVLNDKDLQKVSEFKTGPVVEHPDCFPQCDCSSKANVS
 GGVWKNVNMALLVDTYYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVLPPDNAADIQSEVHC
 MFSPLAEESGQCPDCVVSALGAKVLLSEKDRFINFFVGNNTINSSYPPDYSLSHSIV
 RRLKETQDGFKFLTDQSYIDVLPFEFRDSYPIKYIHAFESNHFIYFLTVQKETLDAQT
 FHTRIIRFCSVDSGLHSYMEMPLECILTEKRRKRSTREEVFNILQAAYVSKPGANL
 AKQIGASPYDDILYGVFAQSKPDSA EPMNRS AVCAFPKIYVNDFFNKIVNKNNVR
 CLQHFYGPNEHC FNRTL LRNSSGCEVRSDEYRTEFTTALQRVDL FMGRLNHVL
 LTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVL SRTAHFTPHVNFLLDSYPVSPEVIVEHP
 SNQNGYTLVVTGKKITKIPLNGLGCGHFQSCSQCLSAPYFIQCGWCHNRCVHSNE
 CPSGTWTQEICLPAVYKVFPTSAPLEGGTMLTICGWDFGFKKNNKFDLRKTKVLL
 GNESCTLTLSESTNTLKCTVGPAMSEHFNVSVIVSNSRETTQYSAFSYVDPVITSI
 SPRYGPHAGGTLTLTGKYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSDSILECYTPGHTVSA
 EFPVKLKIDLADRVTSFSYREDPVVSEIHPTKSFISGGSTITGIGKNLNSVSTPKLV
 IEVHDVGVNYTVACQHRSSSEIICCTTPSLQQLDLQLPLKTKAFFLLDGILSKHFDL
 TYVHDPMFKPFKPVMMISMGNENVVEIKGDDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENLH
 WHSFALLCTVPSDLLKLN GGELNIEWKQAVSSTVLGKVIVQPDQNFALVLFQG
 PDIEPKSCDKTHTCPPCPAPEL IGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQEYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKITVDKSRWQQGNVVFSCSVMHE
 ALFHNYTQKSLSLSPGKR **LDYKDDDDKHVHHHHH**

Os aminoácidos a negrito e em itálico representam a sequência sinal; os aminoácidos a negrito e sublinhados representam a etiqueta Flis.

ECD de c-Met Humano (SEQ ID NO: 75)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQN
 VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSG
 GVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFS
 PQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPHLSISVRRLK
 ETKDGMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFHT
 RIIRFCSINSGLHSEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQI
 GASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFFIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLO
 HFYGPNEHECFNRILLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
 STFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSPVSPVIVEHTLNQ
 NGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLS
 GTWTQQICLPAIYKVFNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE
 SCTLTLSESTMNTLTKCTVGPAMNKHFNMSIHSNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPK
 YGPMAGGTLTLTGNLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFA
 VKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINV
 HEAGRNFVACQHRNSSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGLSKYFDLIY
 VHNVPVFKPFKPMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSE
 AVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNF

Os aminoácidos a negrito e em itálico representam a sequência sinal.

Domínio Sema de c-Met Humano com etiqueta Flis (SEQ ID NO: 76)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQN
 VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSG
 GVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFS
 PQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPHLSISVRRLK
 ETKDGMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFHT
 RIIRFCSINSGLHSEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQI
 GASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFFIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLO
 HFYGPNEHECFNRILLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
 STFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSPVSPVIVEHTLNQ
 NGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLS
 GTWTQQICL**DYKDDDDKHVHHHHHH**

Os aminoácidos a negrito e em itálico representam a sequência sinal; os aminoácidos a negrito e sublinhados representam a etiqueta Flis

Epitopos de Anticorpo C8- no Domínio Extracelular de c-Met Humano

121VVDTYYDDQL₁₃₀ (SEQ ID NO: 77)

131ISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 78)

179ALGAKVLSSVKDRFTNF₁₉₅ (SEQ ID NO: 79)

216VRRLKETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 80)

123DTYYDD₁₂₈ (SEQ ID NO: 81)

144HVFPNHNTADIQS₁₅₆ (SEQ ID NO: 82)

192FINF₁₉₅ (SEQ ID NO: 83)

220KETKDGFM₂₂₇ (SEQ ID NO: 84)

Epitopos de Anticorpo D11- no Domínio Extracelular de c-Met Humano

84YKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANL₉₅ (SEQ ID NO: 85)

95CFPCQDCSSKA₁₀₅ (SEQ ID NO: 86)

Sequências CDR de Consenso

CDR2 da Cadeia Leve do Anticorpo D11-

GTSX₁LX₂S (SEQ ID NO: 87), em que X₁ é Y ou R; e X₂ é A ou R;

CDR1 da Cadeia Leve do Anticorpo C8

SVSSSVX₃SIYLH (SEQ ID NO: 88), em que X₃ é S ou R;

CDR3 da Cadeia Leve do Anticorpo C8-

X₄X₅YX₆GYPLT (SEQ ID NO: 89), em que X₄ é I ou Q, X₅ é Q ou V, e X₆ é S ou R;

CDR2 da Cadeia Pesada do Anticorpo D11-

WIYPVTGDTYYX₇EX₈FKG (SEQ ID NO: 90), em que X₇ é N, I, ou R, e X₈ é K ou P;

CDR3 da Cadeia Pesada do Anticorpo D11-

GYGAFX₉Y (SEQ ID NO: 91), em que X₉ é Y ou F;

CDR2 da Cadeia Pesada do Anticorpo C8-

RVNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEG (SEQ ID NO: 92), em que X₁₀ é N ou Y, X₁₁ é G ou R, e X₁₂ é G ou S;

CDR3 da Cadeia Pesada do Anticorpo C8-

X₁₃NX₁₄LDY (SEQ ID NO: 93), em que X₁₃ é T ou A, e X₁₄ é W ou I;

Sequências de Consenso de Região Variável de Cadeia Leve

Sequência de Consenso da Região Variável de Cadeia Leve do Anticorpo D11- (SEQ ID NO: 94)

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCSVSSSISSSTNLHWYQQKPGQAPRLLIY

GTSX₁I₂SGIPDRFSGSGSGTDFITLITISRLPEPEDFAVY YCQQWSSYPYSFG
QGTKLEIK

em que X₁ é Y ou R, e X₂ é A ou R;

**Sequência de Consenso da Região Variável de Cadeia Leve do
Anticorpo C8- (SEQ ID NO: 95)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSSVX.SIYLHWYQQKPGKAPKLLIY
STSNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCX₄X₅YX₆GYPLTFC
GGTKVEIK

em que X₃ é S ou R, X₄ é I ou Q, X₅ é Q, ou V, e X₆ é S ou
R;

Sequências de Consenso de Região Variável de Cadeia Pesada

**Sequência de Consenso da Região Variável de Cadeia Pesada
do Anticorpo D11- (SEQ ID NO: 96)**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYYHWVRQAPGQGLEWMGW
IYPVTGDTYYX₇EX₈FKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGY
GAFX₉YWGQGTITVTVS

em que X₇ é N, I, ou R, X₈ é K ou P, e X₉ é Y ou F;

**Sequência de Consenso da Região Variável de Cadeia Pesada
do Anticorpo C8- (SEQ ID NO: 97)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHWRQAPGQGLEWMGR
VNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEGRTMTITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARX₁₃
NX₁₄LQYWGQGITVTVS

em que X₁₀ é Y ou N, X₁₁ é G ou R, X₁₂ é S ou G, X₁₃ é A ou
T, e X₁₄ é I ou W.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> Anticorpos de c-Met

<130> X-18217

<150> 61/116825

<151> 2008-11-21

<150> 61/219903

<151> 2009-06-24

<160> 97

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

PE2358755

- 141 -

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 108
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<400> 5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile
20 25 30

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

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

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

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

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

- <210> 6
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> Sequência Artificial

- <220>
- <223> Construção Sintética

<400> 6
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Arg Ser Ile
 20 25 30

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

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

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

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

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

- <210> 7
- <211> 324
- <212> ADN
- <213> Sequência Artificial

- <220>
- <223> Construção Sintética

<400> 7
 gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggcgc aagagccacc 60
 ctctcctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccagctt cctcatctat ggcacatctt atctggettc tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtc ttactgtcaa cagtggagta gttaccogta cagtttoggc 300
caagggacca agttggagat caaa 324

<210> 8
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 8
gaaatttgtgt tgaogcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcct acctggcttc tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtc ttactgtcaa cagtggagta gttaccogta cagtttoggc 300
caagggacca agttggagat caaa 324

<210> 9
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 9
gaaatttgtgt tgaogcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcct gactgagatc tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtc ttactgtcaa cagtggagta gttaccogta cagtttoggc 300
caagggacca agttggagat caaa 324

<210> 10
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 10
gacatccaga tgaaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtccac 60
atcacttgcg gtgtcagctc aagtataagt tccatttact tgcactggta tcagcagaaa 120

```
ccagggaag cccctaagct cctgatctat agcacatcca acttggett c tggagtccca 180
tcaaggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa 240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtatt cagtacagtg gttaccoget cacgttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324
```

<210> 11
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

```
<400> 11
gacatccaga tgaccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcaettgca gtgtcagctc aagtgtacgt tccatttact tgcactggta tcagcagaaa 120
ccagggaag cccctaagct cctgatctat agcacatcca acttggett c tggagtccca 180
tcaaggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa 240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcag gtgtacagtg gttaccoget cacgttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324
```

<210> 12
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

```
<400> 12
gacatccaga tgaccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcaettgca gtgtcagctc aagtgtacgt tccatttact tgcactggta tcagcagaaa 120
ccagggaag cccctaagct cctgatctat agcacatcca acttggett c tggagtccca 180
tcaaggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa 240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcag gtgtacaggg gttaccoget cacgttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324
```

<210> 13
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

```
<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1           5           10           15
```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Arg
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser
115

<210> 14

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Arg
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ile Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Gly Ala Phe Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100

105

110

Thr Val Ser
115

<210> 15
<211> 115
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<400> 15

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Arg
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Glu Pro Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser
115

<210> 16
<211> 114
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<400> 16

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

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

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

Gly Arg Val Asn Pro Asn Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser

<210> 17

<211> 114

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 17

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

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

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

Gly Arg Val Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser

<210> 18
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Val Asn Pro Tyr Arg Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Asn Ile Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser

<210> 19
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 19
 caggtgcagc tgggtgcaqtc tggggctgag gtaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 toctqcaagg ctcttggcta caccttcaca agtaggtata taactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgaqtg gatgggatgg atttatcctg taactggtga tacttactac 180
 aacgagaagt tcaagggcag agtcaagatt accgaggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac accggcgtgt attactgtgc gagaggctac 300
 ggagcttttt actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcc 345

<210> 20
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 20
 cagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtccctc ggtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt ggcacagcc 120
 cctggacaag ggtctgagtg gatgggatgg atttatcctg taactggtga tacttactac 180
 atcgagaagt tcaagggcag agtcacgatt accgcgaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggctat 300
 ggtgcttttt tctactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcc 345

<210> 21
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 21
 cagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtccctc ggtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt ggcacagcc 120
 cctggacaag ggtctgagtg gatgggatgg atttatcctg taactggtga tacttactac 180
 agagagcctt tcaagggcag agtcacgatt accgcgaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggctat 300
 ggggcttttt actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcc 345

<210> 22
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 22
 cagggtccagc tgggtgcagtc tgggtctgag gtgaagaagc ctgggtccctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggcta cacctttacc gactactaca tgcactgggt gcgtcagcc 120
 cctggtcagg gtcttgagtg gatgggtcgt gttaatccta accggggtgg tactacctac 180
 aaccagaaat tcgagggccg tgtcaccatg aocscagaca cctccacgag cacagcctac 240
 atggagctgc gttagcctgc ttctgacgac accgccgtgt attactgtgc gcgtaccgac 300

tggttgact actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cc 342

<210> 23
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 23
caggttcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctgggtgcctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctgggta caaccttacc gactactaca tgcactgggt gogtcaggcc 120
cctgggtcaag gtcttgagtg gatgggtcgt gttaatcctc accggagggg tactacctac 180
aaccagaaat tcgagggccg tgtcaccatg accacagaca catcacagag cacagcctac 240
atggagctgc gtgacctgag ttctgacgac acggccgtgt attactgtgc gogtgogaac 300
tggttgact actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cc 342

<210> 24
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 24
caggttcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctgggtgcctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctgggta cacattcact gactactaca tgcactgggt gogtcaggcc 120
cctgggtcaag gtcttgagtg gatgggtcgt gttaatcctt atgggggtag tactacctac 180
aaccagaaat tcgagggccg tgtcaccatg accacagaca catcacagag cacagcctac 240
atggagctgc gtgacctgag ttctgacgac acggccgtgt attactgtgc gogtgogaac 300
attcttgact actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cc 342

<210> 25
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 25
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 26

<211> 215

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 27

<211> 215

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 28

<211> 215

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 28

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile

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

<210> 29

<211> 215

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 30

<211> 215

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Arg Ser Ile
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 31

<211> 645

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 31

gaaattgtgt tgaccgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 50

ctctctgtca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggtc ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcct acctggcttc tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcaa cagtggagta gttaccgta cagtttcggc	300
caagggacca agttggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgacctgt gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaaq gtggataacg cctccaate gggtaactcc	480
caggagatg tcacagagca ggacagcaag gacagacct acagcctcag cagcacctg	540
acgttgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctggaagt caccatcag	600
ggcctgagct cgcctgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc	645

<210> 32

<211> 645

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 32

gaaatttgtt tgaacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggtt ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcct acctggcttc tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcaa cagtggagta gttaccgta cagtttcggc	300
caagggacca agttggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgacctgt gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaaq gtggataacg cctccaate gggtaactcc	480
caggagatg tcacagagca ggacagcaag gacagacct acagcctcag cagcacctg	540
acgttgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctggaagt caccatcag	600
ggcctgagct cgcctgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc	645

<210> 33

<211> 645

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 33

gaaatttgtt tgaacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggtt ccagcagaaa	120

cctggccagg	ctcccagget	cctcatctat	ggcacatcca	gactgagtc	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgta	ttactgtcaa	cagtggagta	gttaaccgta	cagtttcggc	300
caagggacca	agttggagat	caaacgaact	gtggctgcac	cstctgtctt	catcttcccg	360
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaaact	gcctctgttg	tgtgacctgt	gaataacttc	420
tatcccagag	aggccaaaagt	acagtggaaag	gtggataacg	ccctccaate	gggtaactcc	480
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcaact	acagcctcag	cagcaccctg	540
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgccaagt	cacccatcag	600
ggcctgaget	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgc		645

<210> 34

<211> 645

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 34

gacatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcaacttga	gtgtcagctc	aagtgttaagt	tccatttact	tgcactggta	tcagcagaaa	120
ccagggaaaag	cccctaagct	cctgatctat	agcacatcca	acttggcttc	tggagtccca	180
tcagggttca	gtggcagtgg	atctgggaca	gatttcactc	tcaccatcag	cagtctgcaa	240
cctgaagatt	ttgcaactta	ctactgtatt	cagtacagtg	gttaccocgt	cacgttcggc	300
ggagggacca	aggtggagat	caaacgaact	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	360
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaaact	gcctctgttg	tgtgacctgt	gaataacttc	420
tatcccagag	aggccaaaagt	acagtggaaag	gtggataacg	ccctccaate	gggtaactcc	480
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcaact	acagcctcag	cagcaccctg	540
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgccaagt	cacccatcag	600
ggcctgaget	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgc		645

<210> 35

<211> 645

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 35

gacatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcaacttga	gtgtcagctc	aagtgtatcc	tccatttact	tgcactggta	tcagcagaaa	120
ccagggaaaag	cccctaagct	cctgatctat	agcacatcca	acttggcttc	tggagtccca	180


```

teaaggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcaactc tcaccatcag cagtctgcaa      240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcaa gtctacagtg gttaccctgt cacgttgggc      300
ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcaac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaaact gcctctgttg tgtgctgtct gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaaq gtggataacg ccttccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggcagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgogaagt caccatcag      600
ggcctgagct cgcctgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc                          645

```

<210> 36
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

```

<400> 36
gacatccaga tgaaccagtc tccatctccc ctctctccat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttqca gtgtcagctc aagtgtactt tccatttaet tgcactggta tcagcagaaa      120
ccagggaaag cccctaagct cctgatetat agcaaatcca acttggcttc tggagtccc      180
teaaggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcaactc tcaccatcag cagtctgcaa      240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcag gtgtacaggg gttaccctgt cacgttgggc      300
ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcaac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaaact gcctctgttg tgtgctgtct gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaaq gtggataacg ccttccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggcagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgogaagt caccatcag      600
ggcctgagct cgcctgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc                          645

```

<210> 37
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

```

<400> 37
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1          5          10          15

```

```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Arg

```

			20						25							30
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Ala	Phe	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100					105						110		
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115					120					125				
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
	130					135					140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	
			180					185					190			
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195				200						205				
Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	
	210					215					220					
Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
225					230					235					240	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
				245					250					255		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	
			260					265					270			
Tyr	Val	Asp	Gly	Met	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
		275					280					285				

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 38

<211> 441

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 38

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Arg
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ile Glu Lys Phe

50						55										60
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Ala	Phe	Phe	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100					105					110			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115					120					125				
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
	130					135					140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	
			180					185					190			
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195					200					205				
Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	
	210					215					220					
Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
225					230					235					240	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
			245						250					255		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	
			260					265					270			
Tyr	Val	Asp	Gly	Met	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
		275					280					285				
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	
	290					295					300					
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
305					310					315					320	

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 39

<211> 441

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 39

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Arg
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Glu Pro Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85
 ALA ACG GLY TYR ALA ALA THE TYR TYR 105 GLY GLY GIN GIN TYR THE LEU VAL
 THE VAL SET SET ALA SET THE TYR GLY PRO SET VAL PRO LEU ALA
 PRO CYS SET ACG SET THE SET GIN SET THE ALA ALA LEU GLY CYS LEU
 VAL TYR ASP TYR THE PRO GIN PRO VAL THE VAL SET TIP AN SET GLY
 145 VAL TYR ASP TYR THE PRO GIN PRO VAL THE VAL SET TIP AN SET GLY
 ALA LEU THE SET GLY VAL HIS THE PRO ALA VAL LEU GIN SET SET
 GLY LEU TYR SET LEU SET SET VAL VAL THE VAL PRO SET SET AN THE
 GLY THE GIN THE TYR THE CYS AN VAL ASP HIS TYR PRO SET AN THE
 TYR VAL ASP TYR THE VAL GIN ACG TYR CYS CYS VAL GIN CYS PRO PRO
 CYS PRO ALA PRO PRO VAL ALA GLY PRO SET VAL THE LEU THE PRO PRO
 TYR PRO TYR ASP THE LEU MET ILE SET ACG THE PRO GIN VAL THE CYS
 VAL VAL VAL ASP VAL SET HIS GIN ASP PRO GIN VAL GIN THE AN TIP
 TYR VAL ASP GLY MET GIN VAL HIS AN ALA TYR THE TYR PRO ACG GIN
 GIN GIN PHA AN SET THE PHA ACG VAL VAL MET VAL MET VAL IAN THE VAL VAL
 290 HIS GIN ASP TIP LEU AN GLY TYR GIN TYR TYR TYR CYS TYR VAL SET AN
 305 TYR GLY LEU PRO ALA PRO ILE GIN TYR THE ILE SET TYR THE TYR GLY
 340 ACG GIN PRO GIN VAL TYR THE LEU PRO PRO PRO ACG GIN GIN
 89
 90
 95

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 40

<211> 440

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 40

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

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

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

Gly Arg Val Asn Pro Asn Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

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

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 41

<211> 440

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 41

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

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

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

Gly Arg Val Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

```

145           150           155           160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
           165           170           175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
           180           185           190
Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
           195           200           205
Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
           210           215           220
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
           225           230           235           240
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
           245           250           255
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
           260           265           270
Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
           275           280           285
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
           290           295           300
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
           305           310           315           320
Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
           325           330           335
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
           340           345           350
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
           355           360           365
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
           370           375           380
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
           385           390           395           400
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
           405           410           415

```

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 42

<211> 440

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 42

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

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

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

Gly Arg Val Asn Pro Tyr Arg Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Asn Ile Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly

180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 2
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270
 Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285
 Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 290 295 300
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320
 Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 325 330 335
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 43
 <211> 1323
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 43
 caggtgcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgqctcctc ggtgaaggtc 50
 tectgcaagg ctctctgcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaaq ggcttgaqtg gatgggctgq alttatcctg taactggtga tacttactac 180
 aacggaagt tcaagggcag agtcacgatt accggggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac accggcctgt attactgtgc gagaagctat 300
 ggggctttt actactgggg ccagggcacc ctgggtcaccg tctctcctgc ctccaccaag 360
 ggccctccg tcttccctgt agggcctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc 420
 ctgggtctgc tggctcaagg ctacttccc gaacoggtga cgggtgtctg gaactcagge 480
 gcctgacca ggggctgca caccttccc gctgtctac agtctctagc actctactcc 540
 ctacgcagcg tgggtcagct gacctcagc aacttcggca cccagacctc cacttgcacc 600
 gtagtcaaca agccacgcaa caccaggtg gacaaagacg ttgagcgcaa atgttctgtc 660
 gagtgcacc cgtgccacgc accacatgtg gcaggacgtc cagtcttctt cttccccca 720
 aaccccaagg acacctcat gatctcccg acccctgagg tcaogtgcgt ggtggtggac 780
 gtgagccacg aagaaccgca ggtccagttc aactggtacg tggacggcat ggaggtgcat 840
 aatgccagc caaagcccg gggggagcag ttccaccagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 900
 ctccactctg tgcaccagca ctggtlgaac gycaaagggt acaagtcaa ggtctccaac 960
 aagggctctc cggccccct agagaazacc atctccaaa ccaagggca gccccgagaa 1020
 ccacaggtgt acccctctgc cccatcccg gaggagatga ccaagacca ggtcagcctg 1080
 acctgccttg tcaaggtctt ctaccaccgc gacatcctcg tggagtggg gagccctgg 1140
 cagccggaga acaactaca gaccacact cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1200
 ctctacagca agctcacctt ggacaagagc aggtggcagc aggggaactt ctctctatgc 1260
 tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg 1320
 ggt 1323

<210> 44
 <211> 1323
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 44

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcttgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttalcctg taactgggta tacttactac      180
atcgagaagt tcaagggcag agtcaagatt accgoggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggctat      300
ggtgcttttt tctactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctccgc ctccaccaag      360
ggcccatcgg tcttcocgct agcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc      420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccgggta cgggtgcctg gaactcaggc      480
gcctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtctac agtccctcag actctactcc      540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagacctc cacctgcaac      600
gtagatcaca agcccagcaa caccAaggtg gacaagacag ttgagcgca atgttgtgtc      660
gagtgcctac cgtgcctcagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctc ctcccccca      720
aaacccaagg acacccctcat gatctccggg acccctgagg tcaactgggt ggtggtggac      780
gtgagccacg aagaccnca ggtccagttc aactggtaag tggacggcat ggaggtgcat      840
aatgccaaag caaagccacg ggaggagcag tccaacagca cgttccgtgt ggtcagcctc      900
ctaccgctcg tgcaccagga ctggctgaa cgcaggaggt acaagtgcac ggtctccaac      960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaacc atctccaaa ccaagggca gccccagaa      1020
ccadagggtg acacccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg      1080
acctgctctg tcaaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtgga gagcaatggg      1140
cagccgggag acaactaca gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctctctatc      1200
ctctacagca agctcaccgt ggaacaagac aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc      1260
tcgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg      1320
ggt                                                                                   1323

```

<210> 45

<211> 1323

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 45

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcttgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttalcctg taactgggta tacttactac      180
agagagcctt tcaagggcag agtcaagatt accgoggaca aatccacgag cacagcctac      240

```

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccctgt attactgtgc gagaggtac	300
ggagcttttt actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctctctcngc ctccaccaag	360
ggcccatcgg tcttcccgct aggcacctgc tccaggagca cctccgagag cacagcgcgc	420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaacccgtga cgggtgtcgt gaactcaggc	480
gccctgacca ggggctgca caccttccc gctgtctac agtcctcagg actctactac	540
ctcagcagcg tggtgacct gccctccagc aacttcggca cccagacct cacttgcaac	600
gtagatcaca agcccagca cccaaggty gacaagacag ttgagcgca atgttgttc	660
gagtgcacc cgtgccacc accacctgtg gcaggacct cagtcttct ctccccca	720
aaacccaagg acacctcat gatctccgg acccctgagg tccctgctg gytggtggac	780
gtgagccacg aagacccga ggtccagtc aactggtac tggacggcat ggaggtgat	840
aatgccaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagctc	900
ctcaccgtcg tgcaccagga ctggtgaac ggcaaggagt acaagtgcac ggtctccaac	960
aaaggcctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaa ccaaggcca gccccgagaa	1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg	1080
acctgctcgg tcaaaqctt ctaccccagc gacatcgcg tggagtggga gagcaatggg	1140
cagccggaga acaactaca gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcccttctc	1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacct ettctcatgc	1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg	1320
ggt	1323

<210> 46

<211> 1323

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 46

caggttcagc tggtagctc tggtagctgag gtgaagaagc ctggtgcctc agtgaaggtc	60
tcttgcaagg ctcttggtta caccittacc gactactaca tgcactgggt gcctcagggc	120
cctggtcaag gtcttgagt gatgggtcgt gttaatcta accggggtgg tactacctac	180
aaccagaaat tggagggcg tgtaccctg accacagaca catccacagc cacagcctac	240
atggagctgc gtgacctgc ttctgacgac accgacctgt attactgtgc gcctadgaac	300
tggcttgact actggggcca gggcaccacc gtcacctctc cctccgctc caccagggc	360
ccatcggctt tcccctagc gccctgctcc aggagcact ccgagagcac agccgacctg	420
gctgctcgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcagggcc	480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta 600
 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agtccaaata tggtecccca 660
 tggccaccct gcccaagcac tgaggccgcc gggggaccat cagtcttctt gttcccccca 720
 aaacccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 780
 gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtaag tggatggcgt ggaqqtqcat 840
 aatgccaaga caaagcccgcg ggaggagcag ttcaaacgca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900
 ctccaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaggaggt acaagtgcac ggtctccaac 960
 aaaggcctcc cgtctctcat cgagaaaacc atctccaaag ccaaggggca gccccgagag 1020
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
 acctgctctg tcaaaagcct ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga aagcaatggg 1140
 cagccggaga acaactaca gaccacgect cccgtgctgg actccgaggg ctctctcttc 1200
 ctctacagca ggcataaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt ctctctatgc 1260
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg 1320
 ggt 1323

<210> 47

<211> 1323

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 47

caggttcagc tgggtcagtc tgggtctgag gtgaagagc ctggtgctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ctctctgcta caacttcaact gactactaca tgcactgggt gctcagggc 120
 cctggtcag gtcttgagt gatgggtcgt gttaatccta accggagggg tactacctac 180
 aaccagaaat tcgaggcccg tgtcaccatg accacagaca catccacag cacagcctac 240
 atggagctgc gtgacctgc ttctgacgac accgcccgtgt attactgtgc gcgtgcgac 300
 tggcttgaat actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cctccgctc caccaagggc 360
 ccacgggtct tcccgttagc gccctgctcc aggagcact ccgagagcac agccgcctg 420
 ggtgctctg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta 600
 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agtccaaata tggtecccca 660
 tggccaccct gcccaagcac tgaggccgcc gggggaccat cagtcttctt gttcccccca 720
 aaacccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 780


```

gtgagcgaag gagaccccca ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat      840
aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc      900
ctcacctcc cgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgca ggtctccaac      960
aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaggcca gccccgagag     1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg     1080
acctgcntgg tcaaaaggctt ctaccccagc gacatcgcgc tggagtggga aagcaatggg     1140
cagccggaga acacttcaa gaccacgctt cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc     1200
ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt ctctctatgc     1260
tcctgtatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg     1320
ggt                                                                                   1323

```

<210> 48

<211> 1323

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 48

```

caggttcagc tggtcagtc tgggtctgag gtgaagaagc ctggtgcctc agtgaaggtc      60
tcttgaagg ctcttggta caccttcaat gactactaca tgcactgggt gcctcaggcc     120
cctggtcagg gtcttgagt gatgggtcgt gttaatcctt atcggggtag tactacctad     180
accagaaat tggaggccg tgtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac     240
atggagctgc gtacccctgc ttctgacgac aaggccgtgt attactgtgc gcctgcgaac     300
attcttgact actggggcca gggcacccac gtccaccctt cctcgccttc caccaagggc     360
ccctcgtctt tcccgttagc gccctgctcc aggagcaact ccgagagcac agccgcctg     420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tctcgtggaa ctcaggccgc     480
ctgaccagcg gcctgcacc ctccccgct gtccctacagt cctcaggact ctactcctc     540
agcagcgtgg tgcaccgtcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta     600
gatcacaagc ccagcaaac ctaggtggac aagagagttg agtcccaata tggccccca     660
tgcccacct gccacgacc tggggccgc gggggaccat cagtcttctt gttccccca     720
aaacccaagg acactctcat gatctcccg acccctgagc tcacgtgctt ggtgggtggc     780
gtgagccagg gagaccccca ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat     840
aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc     900
ctcacctcc cgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgca ggtctccaac     960
aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaggcca gccccgagag     1020

```

```

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccsagaacca ggtcagcctg      1080
aactgcctgg tcaaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga asgcaatggg      1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc      1200
ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc      1260
tccgtgatgc atgaggctct gcsaacccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg      1320
ggt                                                                                   1323

```

<210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 49
Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Thr Asp Leu His
1 5 10

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 50
Gly Thr Ser Tyr Leu Ala Ser
1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 51
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Ser
1 5

<210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 52

Gly Thr Ser Arg Leu Arg Ser
1 5

<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<400> 53
Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile Tyr Leu His
1 5 10

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<400> 54
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<400> 55
Ile Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 3

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<400> 56
Gln Val Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 57

Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Arg	Ser	Ile	Tyr	Leu	His
1				5					10		

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 58

Gln	Val	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Pro	Leu	Thr
1				5				

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 59

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Arg	Tyr	Ile	His
1				5				10	

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 60

Trp	Ile	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10				15		

Gly

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<400> 61

Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Tyr
1 5

<210> 62
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 62
Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 63

Gly Tyr Gly Ala Phe Phe Tyr
1 5

<210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 64
Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Glu Pro Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His

-

1 5 10

<210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 66
Arg Val Asn Pro Asn Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 67
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 67
Thr Asn Trp Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 68
Arg Val Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 69
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 69
Ala Asn Trp Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 70
 Arg Val Asn Pro Tyr Arg Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 71
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 71
 Ala Asn Ile Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 72
 <211> 1192
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 72
 Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
 1 5 10 15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
 35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
 50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
 65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
 85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
 100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
 130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
 145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Glu Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
 180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
 195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
 210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
 225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
 245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
 260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
 275 280 285

His Ser Tyr Met Gln Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys

	355					360										365	
Tyr	Val	Asn	Asp	Phe	Phe	Asp	Lys	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Arg		
	370					375					380						
Cys	Leu	Gln	His	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asn	His	Glu	His	Cys	Phe	Asn	Arg		
385					390					395					400		
Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu	Ala	Arg	Arg	Asp	Glu	Tyr		
				405					410					415			
Arg	Thr	Gln	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Met	Gly		
			420					425					430				
Gln	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys	Gly		
		435					440					445					
Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Phe	Met	Gln		
450						455					460						
Val	Val	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	Pro	Ser	Thr	Pro	His	Val	Asn	Phe	Leu		
465					470					475					480		
Leu	Asp	Ser	His	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Val	Glu	His	Thr	Leu		
				485					490					495			
Asn	Gln	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Val	Ile	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	Lys		
			500					505					510				
Ile	Pro	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Cys	Arg	His	Phe	Gln	Ser	Cys	Ser	Gln		
		515					520						525				
Cys	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Phe	Val	Gln	Cys	Gly	Trp	Cys	His	Asp	Lys		
530						535					540						
Cys	Val	Arg	Ser	Glu	Glu	Cys	Leu	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Gln	Gln	Ile		
545					550					555					560		
Cys	Leu	Pro	Ala	Ile	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro	Asn	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu		
				565					570					575			
Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Arg	Arg		
			580					585					590				
Asn	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Lys	Thr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu		
		595					600						605				
Ser	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys		
610						615					620						

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
 625 630 635 640
 Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
 645 650 655
 Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
 660 665 670
 Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
 675 680 685
 His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
 690 695 700
 Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
 705 710 715 720
 Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
 725 730 735
 Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
 740 745 750
 Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
 755 760 765
 Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
 770 775 780
 Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
 785 790 795 800
 Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
 805 810 815
 Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
 820 825 830
 Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
 835 840 845
 Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
 850 855 860
 Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
 865 870 875 880

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
 885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
 900 905 910

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
 915 920 925

Gln Asn Phe Thr Leu Glu Val Leu Phe Glu Gly Pro Asp Ile Glu Pro
 930 935 940

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 945 950 955 960

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 965 970 975

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 980 985 990

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 995 1000 1005

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Tyr
 1010 1015 1020

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 1025 1030 1035

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 1040 1045 1050

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 1055 1060 1065

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Glu Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1070 1075 1080

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 1085 1090 1095

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 1100 1105 1110

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 1115 1120 1125

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 1130 1135 1140

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 1145 1150 1155

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1160 1165 1170

Lys Arg Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys His Val His His
 1175 1180 1185

His His His His
 1190

<210> 73

<211> 1192

<212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<400> 73

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Val Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
 1 5 10 15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
 35 40 45

Glu Thr Ala Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
 50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
 65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
 85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
 100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
 130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
 145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Asn Gln Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
 180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro His
 195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
 210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
 225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Ile His Ala Phe Glu Ser Asn
 245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asn Ala Gln
 260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Leu Asn Ser Gly Leu
 275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415

Arg Ala Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Val Lys Gly
 435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Pro Leu
 485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Pro Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Thr Ser Ala Pro Leu Glu
 565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
 580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
 595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
 610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
 625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
 645 650 655

Pro Ile Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
 660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
 675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
 690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
 705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
 725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
 740 745 750

Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu His
 755 760 765

Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
 770 775 780

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
 785 790 795 800

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
 805 810 815

Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
 820 825 830

Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
 835 840 845

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
 850 855 860

Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
 865 870 875 880

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
 885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
 900 905 910

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
 915 920 925

Gln Asn Phe Thr Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Asp Ile Glu Pro

930 935 940
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 945 950 955 960
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 965 970 975
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 980 985 990
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 995 1000 1005
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 1010 1015 1020
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 1025 1030 1035
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 1040 1045 1050
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 1055 1060 1065
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Glu Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1070 1075 1080
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 1085 1090 1095
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Glu
 1100 1105 1110
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 1115 1120 1125
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 1130 1135 1140
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 1145 1150 1155
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1160 1165 1170
 Lys Arg Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His Val His His
 1175 1180 1185

His His His His
1190

<210> 74

<211> 1194

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

<400> 74

Met Lys Ala Pro Thr Ala Leu Ala Pro Gly Ile Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45

Glu Thr Pro Ile His Asn Val Val Leu His Gly His His Ile Tyr Leu
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Asp Lys Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ser Glu Phe Lys Thr Gly Pro Val Val Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Val Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110

Lys Asp Asn Val Asn Met Ala Leu Leu Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

Val Leu Pro Pro Asp Asn Ala Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160

Met Phe Ser Pro Leu Ala Glu Glu Glu Ser Gly Gln Cys Pro Asp Cys
165 170 175

Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Leu Ser Glu Lys Asp Arg
180 185 190

Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Pro Pro
195 200 205

Asp Tyr Ser Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Gln
 210 215 220

Asp Gly Phe Lys Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro
 225 230 235 240

Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Ile His Ala Phe Glu Ser
 245 250 255

Asn His Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Lys Glu Thr Leu Asp Ala
 260 265 270

Gln Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Val Asp Ser Gly
 275 280 285

Leu His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys
 290 295 300

Arg Arg Lys Arg Ser Thr Arg Glu Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala
 305 310 315 320

Ala Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Asn Leu Ala Lys Gln Ile Gly Ala
 325 330 335

Ser Pro Tyr Asp Asp Ile Leu Tyr Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro
 340 345 350

Asp Ser Ala Glu Pro Met Asn Arg Ser Ala Val Cys Ala Phe Pro Ile
 355 360 365

Lys Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val
 370 375 380

Arg Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn
 385 390 395 400

Arg Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Val Arg Ser Asp Glu
 405 410 415

Tyr Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met
 420 425 430

Gly Arg Leu Asn His Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys
 435 440 445

Gly Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met
 450 455 460

Gln Val Val Leu Ser Arg Thr Ala His Phe Thr Pro His Val Asn Phe

Phe Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Val Val Ser Glu Ile His Pro Thr Lys
 740 745 750
 Ser Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Ile Gly Lys Asn Leu
 755 760 765
 Asn Ser Val Ser Thr Pro Lys Leu Val Ile Glu Val His Asp Val Gly
 770 775 780
 Val Asn Tyr Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Ser Ser Glu Ile Ile
 785 790 795 800
 Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asp Leu Gln Leu Pro Leu
 805 810 815
 Lys Thr Lys Ala Phe Phe Leu Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys His Phe
 820 825 830
 Asp Leu Thr Tyr Val His Asp Pro Met Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro
 835 840 845
 Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Val Glu Ile Lys Gly Asp
 850 855 860
 Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn
 865 870 875 880
 Lys Ser Cys Glu Asn Leu His Trp His Ser Glu Ala Leu Leu Cys Thr
 885 890 895
 Val Pro Ser Asp Leu Leu Lys Leu Asn Gly Gly Glu Leu Asn Ile Glu
 900 905 910
 Trp Lys Gln Ala Val Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln
 915 920 925
 Pro Asp Gln Asn Phe Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Asp Ile
 930 935 940
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 945 950 955 960
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 965 970 975
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 980 985 990

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 995 1000 1005

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 1010 1015 1020

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 1025 1030 1035

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 1040 1045 1050

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 1055 1060 1065

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Glu Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 1070 1075 1080

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 1085 1090 1095

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 1100 1105 1110

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 1115 1120 1125

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 1130 1135 1140

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 1145 1150 1155

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 1160 1165 1170

Pro Gly Lys Arg Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His Val
 1175 1180 1185

His His His His His His
 1190

<210> 75

<211> 932

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 75

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe

1 5 10 15
 Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
 20 25 30
 Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
 35 40 45
 Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
 50 55 60
 Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
 65 70 75 80
 Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
 85 90 95
 Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
 100 105 110
 Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 115 120 125
 Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
 130 135 140
 Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
 145 150 155 160
 Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175
 Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
 180 185 190
 Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
 195 200 205
 His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
 210 215 220
 Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
 245 250 255
 Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
 260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
 275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
 485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525

Cys 530	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Phe 535	Val	Gln	Cys	Gly	Trp 540	Cys	His	Asp	Lys
Cys 545	Val	Arg	Ser	Glu	Glu 550	Cys	Leu	Ser	Gly	Thr 555	Trp	Thr	Gln	Gln	Ile 560
Cys	Leu	Pro	Ala	Ile 565	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro 570	Asn	Ser	Ala	Pro	Leu 575	Glu
Gly	Gly	Thr	Arg 580	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly 585	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe 590	Arg	Arg
Asn	Asn	Lys 595	Phe	Asp	Leu	Lys	Lys 600	Thr	Arg	Val	Leu	Leu 605	Gly	Asn	Glu
Ser	Cys 610	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser 615	Glu	Ser	Thr	Met	Asn 620	Thr	Leu	Lys	Cys
Thr 625	Val	Gly	Pro	Ala	Met 630	Asn	Lys	His	Phe	Asn 635	Met	Ser	Ile	Ile	Ile 640
Ser	Asn	Gly	His	Gly 645	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser 650	Thr	Phe	Ser	Tyr	Val 655	Asp
Pro	Val	Ile	Thr 660	Ser	Ile	Ser	Pro	Lys 665	Tyr	Gly	Pro	Met	Ala 670	Gly	Gly
Thr	Leu	Leu 675	Thr	Leu	Thr	Gly	Asn 680	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly 685	Asn	Ser	Arg
His 690	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys 695	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys 700	Ser	Val	Ser	Asn
Ser 705	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr 710	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr 715	Ile	Ser	Thr	Glu	Phe 720
Ala	Val	Lys	Leu	Lys 725	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn 730	Arg	Glu	Thr	Ser	Ile 735	Phe
Ser	Tyr	Arg	Glu 740	Asp	Pro	Ile	Val	Tyr 745	Glu	Ile	His	Pro	Thr 750	Lys	Ser
Phe	Ile	Ser 755	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile 760	Thr	Gly	Val	Gly	Lys 765	Asn	Leu	Asn
Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met 775	Val	Ile	Asn	Val	His 780	Glu	Ala	Gly	Arg

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
785 790 795 800

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
805 810 815

Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
820 825 830

Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
835 840 845

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
850 855 860

Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
865 870 875 880

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
900 905 910

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
915 920 925

Gln Asn Phe Thr
930

<210> 76

<211> 578

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 76

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
 85 90 95
 Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
 100 105 110
 Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 115 120 125
 Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
 130 135 140
 Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
 145 150 155 160
 Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175
 Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
 180 185 190
 Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
 195 200 205
 His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
 210 215 220
 Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
 245 250 255
 Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
 260 265 270
 Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
 275 280 285
 His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300
 Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320
 Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
 485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560

Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His Val His His His His
 565 570 575

His His

<210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 77
Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu
 1 5 10

<210> 78
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 78
Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe
 1 5 10 15

Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln
 20 25

<210> 79
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 79
Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn
 1 5 10 15

Phe Phe

<210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 80
Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met
 1 5 10

<210> 81
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 81
Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 1 5

<210> 82
 <211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 82

His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser
1 5 10

<210> 83

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 83

Phe Ile Asn Phe
1

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 84

Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met
1 5

<210> 85

<211> 24

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 85

Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe Pro Cys Gln
1 5 10 15

Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu
20

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 86

Cys Phe Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 87
Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Ser
1 5

<210> 88
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 88
Ser Val Ser Ser Ser Val Xaa Ser Ile Tyr Leu His
1 5 10

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Construção Sintética

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 89
Xaa Xaa Tyr Xaa Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 90
<211> 17
<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 90

Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Xaa Glu Xaa Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 91

Gly Tyr Gly Ala Phe Xaa Tyr
1 5

<210> 92

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 92

Arg Val Asn Pro Xaa Arg Xaa Xaa Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 93

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 93

Xaa Asn Xaa Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 94

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (54)..(54)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (56)..(56)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 94

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

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

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu


```

          35                40                45
Ile Tyr Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
   50                55                60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
  65                70                75                80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
      85                90                95
Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100                105

```

<210> 95

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (90)..(91)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 95

```

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

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Xaa Ser Ile
 20                25                30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Tyr Xaa Gly Tyr Pro
 85 90 95

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

<210> 96

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Construção Sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (63)..(63)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (104)..(104)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 96

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Arg
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Xaa Glu Xaa Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Gly Ala Phe Xaa Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser
 115

<210> 97

<211> 114

<212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (56)..(57)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (99)..(99)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (101)..(101)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 97
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Val Asn Pro Xaa Arg Xaa Xaa Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Xaa Asn Xaa Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110
 Val Ser

Lisboa, 26 de outubro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal de c-Met, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, compreendendo três regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDR) e três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDR), em que LCDR1 compreende a sequência de aminoácidos SVSSSVSSIY LH (SEQ ID NO: 53), LCDR2 compreende a sequência de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 54), LCDR3 compreende a sequência de aminoácidos QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 56), HCDR1 compreende a sequência de aminoácidos GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 65), HCDR2 compreende a sequência de aminoácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 68), e HCDR3 compreende a sequência de aminoácidos ANWLDY (SEQ ID NO: 69).

2. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com a reivindicação 1 que se liga a um epítipo dentro da cadeia α de c-Met humano e induz a internalização de c-Met humano da superfície celular.

3. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 que induz a internalização de c-Met humano da superfície celular independente do fator de crescimento de hepatócitos (HGF).

4. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de liga-

ção ao antigénio deste, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, se liga dentro de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de:

- a) ${}_{121}\text{VVDTYYDDQL}_{130}$ (SEQ ID NO: 77),
- b) ${}_{131}\text{ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS}_{156}$ (SEQ ID NO: 78),
- c) ${}_{179}\text{ALGAKVLSSVKDRFINF}_{195}$ (SEQ ID NO: 79), e
- d) ${}_{216}\text{VRRLKETKDGFM}_{227}$ (SEQ ID NO: 80).

5. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, se liga dentro de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de:

- a. ${}_{123}\text{DTYYDD}_{128}$ (SEQ ID NO: 81),
- b. ${}_{144}\text{HVFPNHTADIQS}_{156}$ (SEQ ID NO: 82),
- c. ${}_{192}\text{FINF}_{195}$ (SEQ ID NO: 83), e
- d. ${}_{220}\text{KETKDGFM}_{227}$ (SEQ ID NO: 84).

6. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, se liga a uma sequência de aminoácidos dentro do epitopo conformacional **caracterizado por** ${}_{123}\text{DTYYDD}_{128}$ (SEQ ID NO: 81), ${}_{144}\text{HVFPNHTADIQS}_{156}$ (SEQ ID NO: 82), ${}_{192}\text{FINF}_{195}$ (SEQ ID NO: 83), e ${}_{220}\text{KETKDGFM}_{227}$ (SEQ ID NO: 84) inclusive.

7. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores que compreende uma região variável de cadeia leve (LCVR) e uma região variável de cadeia pesada (HCVR), em que a LCVR compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 e a HCVR compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

8. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 compreendendo uma cadeia leve possuindo uma região constante capa e uma cadeia pesada possuindo uma região constante de cadeia pesada de IgG4.

9. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 compreendendo uma cadeia leve codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 35, e uma cadeia pesada codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 47.

10. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 compreendendo duas cadeias leves codificadas pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 35 e duas cadeias pesadas codificadas pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 47.

11. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 8, em que a sequência de aminoácidos da referida cadeia leve é idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 35; e a sequência de aminoácidos da referida cadeia pesada é idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 47.

12. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e 10, compreendendo duas cadeias leves em que a sequência de aminoácidos da cadeia leve é idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 35; e duas cadeias pesadas em que a sequência de aminoácidos da cadeia pesada é idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 47.

13. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, compreendendo uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e uma cadeia pesada possuindo uma região constante de cadeia pesada de IgG4.

14. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e 13 compreendendo duas cadeias leves possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 e duas cadeias pesadas possuindo uma região constante de cadeia pesada de IgG4.

15. Composição farmacêutica, compreendendo o anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações anteriores, e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

16. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 14 para utilização em terapia.

17. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de qualquer uma das reivindicações 1 a 14 para utilização no tratamento de cancro num humano.

18. Anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, de acordo com a reivindicação 17, em que o referido cancro é cancro gástrico, do rim, do cólon, colorretal, da cabeça e do pescoço, da próstata, melanoma ou do pulmão.

Lisboa, 26 de outubro de 2015

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * WO 09007427 A
- * WO 05018382 A
- * US 4816307 A
- * US 5225509 A
- * US 5683761 A
- * WO 0064946 A
- * US 5688232 A
- * WO 61116825 A
- * WO 61219903 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * HARLOW ; LANE. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1968
- * MARIE-PAULE LEFRANC ; GERARD LEFRANC. Immunoglobulin FactsBook. Academic Press, 2001
- * LEVITT. J. Mol Biol., 1983, vol. 168, 595-620
- * JONES et al. Nature, 1986, vol. 321, 522-525
- * RIECHMANN et al. Nature, 1988, vol. 332, 323-327
- * VERHOEYEN et al. Science, 1988, vol. 239, 1534-1536
- * WU et al. J. Mol Biol., 1989, vol. 204, 161-162
- * HARLOW ; LANE. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1968, 567-568
- * Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Mack Publishing Co, 1995
- * LIU et al. Expert Opin. Investig. Drugs, 2008, vol. 17 (7), 997-1011
- * YAMADA et al. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2002, vol. 16 (4), 293-299
- * MENDOZA et al. Anal. Chem., 2008, vol. 80 (8), 2895-2904
- * DHUNGANA et al. Methods Mol Biol., 2009, vol. 524, 87-101