

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

|                                                                    |                                                                                                                                                                |                                                               |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| (22) Data de pedido: <b>2005.01.07</b>                             | (73) Titular(es):<br><b>PFIZER INC.</b>                                                                                                                        |                                                               |
| (30) Prioridade(s): <b>2004.01.09 US 535490 P</b>                  | <b>235 EAST 42ND STREET NEW YORK, NY 10017</b>                                                                                                                 | <b>US</b>                                                     |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2010.04.21</b>               | <b>AMGEN FREMONT INC.</b>                                                                                                                                      | <b>US</b>                                                     |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2011.08.31</b><br><b>236/2011</b> | (72) Inventor(es):<br><b>MARY HAAK-FRENDSCO</b><br><b>NICHOLAS PULLEN</b><br><b>ELIZABETH MOLLOY</b><br><b>SIRID-AIMEE KELLERMANN</b><br><b>LARRY L. GREEN</b> | <b>US</b><br><b>GB</b><br><b>GB</b><br><b>US</b><br><b>US</b> |
|                                                                    | (74) Mandatário:<br><b>JOÃO PEREIRA DA CRUZ</b><br><b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b>                                                                | <b>PT</b>                                                     |

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS CONTRA MADCAM**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO ESTÁ RELACIONADO COM ANTICORPOS INCLUINDO ANTICORPOS HUMANOS E PORÇÕES DOS MESMOS DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO QUE ESPECIFICAMENTE SE LIGAM A MADCAM, DE PREFERÊNCIA MADCAM HUMANO E QUE FUNCIONAM PARA INIBIR MADCAM. O INVENTO TAMBÉM ESTÁ RELACIONADO COM ANTICORPOS ANTI-MADCAM HUMANOS E PORÇÕES DOS MESMOS DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO. O INVENTO TAMBÉM ESTÁ RELACIONADO COM ANTICORPOS QUE SÃO ANTICORPOS QUIMÉRICOS, BIESPECÍFICOS, DERIVATIZADOS, DE CADEIA SIMPLES OU PORÇÕES DE PROTEÍNAS DE FUSÃO. O INVENTO TAMBÉM ESTÁ RELACIONADO COM CADEIAS PESADAS E LEVES ISOLADAS DE IMUNOGLOBULINAS DERIVADAS DE ANTICORPOS HUMANOS ANTI-MADCAM E MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICADORES DE TAIS IMUNOGLOBULINAS. O PRESENTE INVENTO TAMBÉM ESTÁ RELACIONADO COM MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS HUMANOS ANTI-MADCAM, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO ESTES ANTICORPOS E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS E DAS COMPOSIÇÕES PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO. O INVENTO PROPORCIONA IGUALMENTE MÉTODOS DE TERAPIA GÉNICA USANDO MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICADORAS DAS MOLÉCULAS DAS CADEIAS PESADAS E/OU LEVES DE IMUNOGLOBULINA QUE CONSTITUEM OS ANTICORPOS ANTI-MADCAM HUMANOS. O INVENTO TAMBÉM ESTÁ RELACIONADO COM ANIMAIS OU PLANTAS TRANSGÉNICOS COMPREENDENDO DE MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO DO INVENTO.

**RESUMO****"ANTICORPOS CONTRA MAdCAM"**

O presente invento está relacionado com anticorpos incluindo anticorpos humanos e porções dos mesmos de ligação ao antigénio que especificamente se ligam a MAdCAM, de preferência MAdCAM humano e que funcionam para inibir MAdCAM. O invento também está relacionado com anticorpos anti-MAdCAM humanos e porções dos mesmos de ligação ao antigénio. O invento também está relacionado com anticorpos que são anticorpos quiméricos, biespecíficos, derivatizados, de cadeia simples ou porções de proteínas de fusão. O invento também está relacionado com cadeias pesadas e leves isoladas de imunoglobulinas derivadas de anticorpos humanos anti-MAdCAM e moléculas de ácido nucleico codificadores de tais imunoglobulinas. O presente invento também está relacionado com métodos de produção de anticorpos humanos anti-MAdCAM, composições compreendendo estes anticorpos e métodos de utilização dos anticorpos e das composições para diagnóstico e tratamento. O invento proporciona igualmente métodos de terapia génica usando moléculas de ácido nucleico codificadoras das moléculas das cadeias pesadas e/ou leves de imunoglobulina que constituem os anticorpos anti-MAdCAM humanos. O invento também está relacionado com animais ou plantas transgênicos compreendendo de moléculas de ácido nucleico do invento.

## DESCRIÇÃO

### "ANTICORPOS CONTRA MAdCAM"

Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisória dos Estados Unidos 60/535490, entregue em 9 de Janeiro, 2004.

### FUNDAMENTO DO INVENTO

A molécula mucosal adressina de adesão celular (MAdCAM) é um membro da superfamília das imunoglobulinas dos receptores de adesão celular. A selectividade do alojamento de linfócito em tecidos linfóides especializados e locais das mucosas do trato gastrointestinal é determinada pela expressão endotelial de MAdCAM (Berlin, C. *et al.*, *Cell*, 80:413-422(1994); Berlin, C., *et al.*, *Cell*, 74:185-195 (1993); e Erle, D.J., *et al.*, *J. Immunol.*, 153: 517-528 (1994)). MAdCAM é expressa unicamente na superfície celular de vénulas endoteliais altas do tecido linfóide intestinal organizado, como seja as placas de Peyer e nódulos linfáticos mesentéricos ((Streeter *et al.*, *Nature*, 331:41-6 (1988); Nakache *et al.*, *Nature*, 337:179-81 (1989); Briskin *et al.*, *Am. J. Pathol.* 151:97-110 (1997)) mas também noutros órgãos linfóides, tais como pâncreas, vesícula biliar e vénulas esplénicas e sinus marginal da polpa branca esplénica (Briskin *et al.*(1997), *supra*; Kraal *et al.*, *Am. J. Path.*, 147: 763-771(1995)).

Apesar de mAdCAM desempenhar um papel fisiológico na vigilância imune do tubo digestivo, parece facilitar a extravasação linfocitária excessiva na doença inflamatória intestinal nas condições de inflamação crónica do trato gastrointestinal. TNF $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de MAdCAM endotelial e, nas amostras de biopsias retiradas de doentes com doença de Crohn e colite ulcerativa, existe um aumento focal de aproximadamente 2-3 vezes da expressão de MAdCAM em locais de inflamação (Briskin *et al.* (1997), Souza *et al.*, Gut, 45:856-63 (1999); Arihiro *et al.*, Pathol Int., 52:367-74 (2002)). Padrões semelhantes de expressão elevada foram observados em modelos experimentais de colite (Hesterberg *et al.*, Gastroenterology, 111:1373-1380 (1997); Picarella *et al.*, J. Immunol., 158: 2099-2106 (1997); Connor *et al.*, J Leukoc Biol., 65:349-55 (1999); Kato *et al.*, J Pharmacol Exp Ther., 295:183-9 (2000); Hokari *et al.*, Clin Exp Immunol., 26:259-65 (2001); Shigematsu *et al.*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 281:G1309-15 (2001)). Noutros modelos pré-clínicos para as condições inflamatórias, tais como diabetes dependentes de insulina (Yang *et al.*, Diabetes, 46:1542-7 (1997); Hänninen *et al.*, J Immunol., 160:6018-25 (1998)), doença de enxerto versus hospedeiro ((Fujisaki *et al.*, Scand J Gastroenterol., 38:437-42 (2003), Murai *et al.*, Nat Immunol., 4:154-60 (2003)), doença hepática crónica ((Hillan *et al.*, Liver, 19:509-18 (1999); Grant *et al.*, Hepatology, 33:1065-72 (2001)), encefalopatia inflamatória ((Stalder *et al.*, Am J Pathol.,



153:767-83 (1998); Kanawar *et al.*, Immunol Cell Biol., 78:641-5 (2000)), e gastrite ((Barrett *et al.*, J Leukoc Biol., 67:169-73 (2000); Hatanaka *et al.*, Clin Exp Immunol., 130:183-9 (2002)), existe recomeço da expressão de MAdCAM fetal e participação de linfócitos  $\alpha_4\beta_7^+$  activados na patogénese da doença. Nestes modelos inflamatórios, assim como em modelos colíticos de murganhos na transferência mediada por hapteno (*e.g.*, TNBS, DSS, etc.) ou transferência adoptiva ( $CD4^+CD45Rb^{high}$ ), o anticorpo monoclonal (mAb) de rato anti-MAdCAM de murganho, MECA-367, o qual bloqueia a ligação de linfócitos  $\alpha_4\beta_7^+$  a MAdCAM, reduz o recrutamento de linfócitos, extravasação de tecidos, inflamação e gravidade da doença. Também foram descritos anticorpos monoclonais (mAbs) de murganho contra MAdCAM humano (*ver, e.g.*, WO 96/24673 e WO 99/58573).

Considerando o papel de MAdCAM na doença inflamatória intestinal (IBD) e noutras doenças inflamatórias associadas ao trato gastrointestinal ou a outros tecidos, é desejável um meio para inibir a ligação a  $\alpha_4\beta_7^+$  e o recrutamento de leucócitos mediado por MAdCAM. Poderá ainda ser desejável dispor de tais meios terapêuticos com propriedades vantajosas, incluindo mas não estando limitado à ausência de interacções indesejáveis com outras medicações nos doentes e propriedades fisicoquímicas favoráveis tais como valores pK/pD em humanos, solubilidade, estabilidade, vida de prateleira e semi-vida *in vivo*. Uma proteína terapêutica, como seja um anticorpo, vantajosamente não incluirá modificações pós-tradução ou formação de agregados

indesejáveis. Assim, existe a necessidade crítica de anticorpos terapêuticos anti-MAdCAM.

#### SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona:

Forma de realização ("E") 1. Um anticorpo monoclonal ou uma sua porção de ligação ao antigénio que se liga especificamente a MAdCAM com um  $K_d$  de  $2,35 \times 10^{-11}M$  ou inferior, medido por ressonância de plasmões de superfície e inibe a ligação de MAdCAM humana a  $\alpha_4\beta_7^+$ , em que a cadeia pesada do anticorpo ou porção do mesmo de ligação ao antigénio compreende as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e em que a cadeia leve do anticorpo ou sua porção de ligação ao antigénio compreende as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve, do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

E2. Um anticorpo monoclonal ou uma porção de ligação ao antigénio do mesmo que se liga especificamente a MAdCAM com um  $K_d$  de  $2,35 \times 10^{-11}M$  ou inferior, medido por ressonância de plasmões de superfície e que inibe a ligação de MAdCAM humana a  $\alpha_4\beta_7^+$ , em que a cadeia pesada do anticorpo ou porção do mesmo de ligação ao antigénio compreende as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 em SEQ ID NO:34 e a cadeia leve do anticorpo ou sua porção de ligação ao antigénio compreende as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 em SEQ ID NO:36.

E3. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E1 ou 2, em que o anticorpo ou porção compreende uma cadeia pesada que utiliza um gene VH 1-18 humano.

E4. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E1 ou 2, em que o anticorpo ou porção compreende uma cadeia leve que utiliza um gene V<sub>K</sub> A2 humano.

E5. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E1, em que o referido anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma ou mais das sequências de aminoácidos FR1, FR2, FR3 e FR4 do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma N° de Acesso ECACC 03090909 (designação interna 7.16.6).

E6. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E2, em que o referido anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma ou mais das sequências de aminoácidos FR1, FR2, FR3 e FR4 em SEQ ID NO:34 ou SEQ ID NO:36.

E7. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno em que a cadeia pesada e a cadeia leve compreendem as sequências de aminoácidos desde o começo da CDR1 até ao final da CDR3 da cadeia pesada e da cadeia leve, respectivamente, do anticorpo monoclonal produzido

pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

E8. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com E7, em que os domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve do anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada e da cadeia leve, respectivamente, do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

E9. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com E7 compreendendo as sequências de aminoácidos da cadeia pesada e leve do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

E10. O anticorpo monoclonal de acordo com E9, em que o anticorpo é o anticorpo monoclonal humano produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

E11. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com E7, compreendendo as sequências de aminoácidos da cadeia pesada e da cadeia leve do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6), em que está eliminada a lisina C-terminal da cadeia pesada.

E12. Um anticorpo monoclonal ou sua porção de ligação ao antígeno, em que a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos desde o começo da CDR1 até ao final da CDR3 em SEQ ID NO:34 e a cadeia leve, compreende a sequência de aminoácidos desde o começo da CDR 1 até ao final da CDR3 em SEQ ID NO:36.

E13. O anticorpo monoclonal ou sua porção de ligação ao antígeno de acordo com E12, em que a cadeia pesada do anticorpo ou da porção de ligação ao antígeno do mesmo compreende a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada em SEQ ID NO:34 e a cadeia leve do anticorpo ou sua porção de ligação ao antígeno compreende a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve em SEQ ID NO:36.

E14. Um anticorpo monoclonal de acordo com E12 compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID Nos:34 e 36 sem as sequências sinal.

E15. Um anticorpo monoclonal de acordo com E12 compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NOs:34 e 36 sem as sequências sinal e em que a lisina C-terminal da cadeia pesada foi cortada.

E16. Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma de E1 a E15 que é uma molécula de imunoglobulina G (IgG), de IgM, de IgE, de IgA ou de IgD, ou um anticorpo biespecífico.

E17. Uma porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma de E1 a 15 que é um fragmento Fab, um fragmento  $F(ab')_2$ , um fragmento  $F_v$  ou um anticorpo de cadeia simples.

E 18. Uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma de E 1 a 17 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

E 19. A composição farmacêutica de acordo com E 18 compreendendo ainda um ou mais de outros agentes anti-inflamatórios ou imunomoduladores.

E 20. A composição farmacêutica de acordo com E 19, em que um ou mais de outros agentes anti-inflamatórios ou imunomoduladores são seleccionados do grupo consistindo em: corticosteróides, amino-salicilatos, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, FK506, IL-10, GM-CSF, rapamicina, agentes anti-TNF $\alpha$  e antagonistas de moléculas de fusão.

E 21. Uma vacina compreendendo o anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma de E1 a 17 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

E 22. A vacina de acordo com E21, em que a vacina é mucosal.

E 23. Um kit de diagnóstico compreendendo o anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma de E1 a 17.

E 24. Uma linha celular de hibridoma que produz um anticorpo monoclonal humano que se liga especificamente à Molécula Mucosal Adressina de Adesão Celular (MAdCAM), em que o hibridoma é o hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

E 25. Uma linha celular isolada que produz o anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma de E1 a 17.

E 26. A linha celular de acordo com E25 que produz o anticorpo da reivindicação 9 ou 14.

E 27. Uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer um de E 1 a 16.

E 28. Um vector compreendendo a molécula de ácido nucleico de acordo com E27.

E 29. Uma célula hospedeira compreendendo o vector de acordo com E28 ou a molécula de ácido nucleico de acordo com E27.

E30. Uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia pesada ou porção de ligação ao antígeno da mesma e uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia leve ou porção de ligação ao antígeno da mesma, do anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma de E 1 a 17.

E 31. Um método para a produção de um anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a MAdCAM, compreendendo a célula hospedeira de acordo com E29 ou 30 ou a linha celular de acordo com E24 ou 25 em condições adequadas e recuperação do anticorpo ou da porção de ligação ao antígeno.

E 32. Um animal transgênico não humano ou planta transgênica compreendendo uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia pesada ou uma porção de ligação ao antígeno da mesma e uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia leve ou uma porção de ligação ao antígeno da mesma, de um anticorpo de acordo com qualquer uma de E1 a 16, em que são expressos os polipéptidos da cadeia pesada e da cadeia leve codificados pelas moléculas de ácido nucleico.

E 33. Um método de isolamento de um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga a MAdCAM, compreendendo o passo de isolamento do anticorpo a partir do animal transgênico não humano ou planta transgênica de acordo com E32.



E 34. Um anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma de E1 a 17, em que o anticorpo ou porção inibe a ligação de MADCAM a  $\alpha 4\beta 7$ , para usar no tratamento de doença inflamatória num indivíduo necessitado.

E 35. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de E34, em que a doença inflamatória é uma doença inflamatória do trato gastrointestinal.

E 36. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de E 35, em que a doença inflamatória do trato gastrointestinal é seleccionada do grupo consistindo em doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença diverticular, gastrite, doença hepática, esclerose biliar primária e colangite esclerosante.

E 37. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de E35, em que a doença inflamatória do trato gastrointestinal é doença inflamatória intestinal, doença de Crohn ou colite ulcerativa.

E 38. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de E 34, em que a doença inflamatória é diabetes dependente de insulina ou doença de enxerto contra hospedeiro.

E 39. Um anticorpo monoclonal ou porção de

ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma de E1 a 17, em que o anticorpo ou porção é marcado de forma detectável, para usar na detecção de inflamação num indivíduo.

E 40. Um anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma de E1 a 17 para usar para determinar se existe um aumento no nível de circulação de leucócitos que expressam  $\alpha_4\beta_7$  e assim detectar o efeito da administração de um anticorpo inibidor anti-MAdCAM ou porção de ligação ao antígeno do mesmo a um indivíduo.

E 41. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E40, em que os leucócitos são linfócitos.

E 42. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E 40, em que o aumento no nível de leucócitos que expressam  $\alpha_4\beta_7$  é determinado por análise FACS.

E 43. Um anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma de E1 a 17 para usar como um medicamento.

E 44. Um método para o diagnóstico de um distúrbio caracterizado pela circulação de MAdCAM humana solúvel, compreendendo os passos de: (1) contacto de uma amostra biológica com o anticorpo monoclonal ou porção de

ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma de E1 a 17 e (2) detecção da ligação do anticorpo ou porção a MAdCAM.

E 45. Um vector de acordo com E28, em que o vector compreende uma sequência de controlo da expressão operacionalmente ligada à molécula de ácido nucleico.

#### Breve descrição dos desenhos

Figura 1 é um alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas das regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve capa de doze anticorpos monoclonais humanos anti-MAdCAM com as sequências de aminoácidos germinais dos correspondentes genes humanos.

Figura 1A mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia pesada para os anticorpos 1.7.2 e 1.8.2 com o produto do gene VH3-15 humano germinal.

Figura 1B mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos prevista da cadeia pesada para o anticorpo 6.14.2 com o produto do gene VH 3-23 humano germinal.

Figura 1 mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia pesada do anticorpo 6.22.2 com o produto do gene VH 3-33 humano germinal.

Figura 1D mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia pesada para o anticorpo 6.34.2 com o produto do gene VH 3-30 humano germinal.

Figura 1E mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia pesada para o anticorpo 6.67.1 com o produto do gene VH 4-4 humano germinal.

Figura 1F mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia pesada para o anticorpo 6.73.1 com o produto do gene VH 3-23 humano germinal.

Figura 1G mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia pesada para o anticorpo 6.77.1 com o produto do gene VH 3-21 humano germinal.

Figura 1H mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia pesada para os anticorpos 7.17.6 e 7.26.4 com o produto do gene VH 1-18 humano germinal.

Figura 1I mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia pesada para o anticorpo 7.20.5 com o produto do gene VH 4-4 humano germinal.

Figura 1J mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia pesada para o anticorpo 9.8.2 com o produto do gene VH 3-33 humano germinal.

Figura 1K mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para os anticorpos 1.7.2 e 1.8.2 com o produto do gene A3 humano germinal.

Figura 1L mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para o anticorpo 6.14.2 com o produto do gene 012 humano germinal.

Figura 1M mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para o anticorpo 6.22.2 com o produto do gene A26 humano germinal.

Figura 1N mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para o anticorpo 6.34.2 com o produto do gene 012 humano germinal.

Figura 1O mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para o anticorpo 6.67.1 com o produto do gene B3 humano germinal.

Figura 1P mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para o anticorpo 6.73.2 com o produto do gene 012 humano germinal.

Figura 1Q mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para o anticorpo 6.77.1 com o produto do gene A2 humano germinal.

Figura 1R mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para os anticorpos 7.16.6 e 7.26.4 com o produto do gene A2 humano germinal.

Figura 1S mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para o anticorpo 7.20.5 com o produto do gene A3 humano germinal.

Figura 1T mostra um alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve capa para o anticorpo 9.8.2 com o produto do gene 018 humano germinal.

Figura 2 são alinhamentos CLUSTAL para as sequências de aminoácidos deduzidas da cadeia pesada e leve capa dos anticorpos humanos anti-MAdCAM.

Figura 2A é um alinhamento CLUSTAL e árvore radial das sequências de aminoácidos deduzidas da cadeia leve capa mostrando o grau de similaridade entre as cadeias leve capa dos anticorpos anti-MAdCAM.

Figura 2B é um alinhamento CLUSTAL e árvore radial das sequências de aminoácidos deduzidas da cadeia pesada mostrando o grau de similaridade entre as cadeias pesadas dos anticorpos anti-MAdCAM.

Figura 3 é um alinhamento CLUSTAL da sequência de aminoácidos dos dois domínios N-terminais de MAdCAM cinomolgo e humano que forma o domínio de ligação  $\alpha 4\beta 7$ . As cadeias  $\beta$  estão alinhadas de acordo com Tan *et al.*, Structure (1998) 6:793-801.

Figura 4 é um gráfico representando os efeitos de

dose de 1.7.2 e 7.16.6 purificados biotinilados na adesão de linfócitos do sangue periférico humano a secções de endotélio de fígado humano congelado expressando MAdCAM.

Figura 5 mostra uma representação gráfica bidimensional baseada nos dados da Tabela 7 da diversidade de epitopos MAdCAM aos quais se ligam os anticorpos anti-MAdCAM, 1.7.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2. Os anticorpos anti-MAdCAM dentro dos mesmos círculos mostram o mesmo padrão de reactividade, pertencem ao mesmo compartimento de epitopos e provavelmente reconhecem o mesmo epitopo em MAdCAM. Os clones de anticorpos anti-MAdCAM dentro dos círculos sobreponíveis são incapazes de se ligarem simultaneamente e provavelmente reconhecem, portanto, um epitopo sobreponível em MAdCAM. Os círculos que não se sobrepõem representam clones de anticorpos anti-MAdCAM com separação espacial distinta dos epitopos.

Figura 6 mostra dados de uma ELISA tipo sanduíche com os anticorpos anti-MAdCAM 1.7.2 e 7.16.6 marcados com Alexa 488, mostrando que os dois anticorpos que são capazes de detectar diferentes epitopos em MAdCAM poderão ser usados para detectar MAdCAM solúvel para fins de diagnóstico.

Figura 7 mostra o efeito de um anticorpo inibidor anti-MAdCAM (1 mg/kg) no número de linfócitos periféricos circulantes  $\alpha_4\beta_7^+$ , expresso como o número de vezes de

aumento relativamente ao mAb controlo IgG2a ou veículo, usando o mAb anti-MAdCAM 7.16.6 num modelo de macaco cinomolgo.

### DESCRIÇÃO DETALHADA

#### Definições e técnicas gerais

A menos que de outra forma seja aqui definido, ps termos científicos e técnicos usados em associação com o presente invento deverão ter os significados normalmente entendidos pelos familiarizados com área. Ainda, a menos que de outra forma seja necessário pelo contexto, os termos no singular deverão incluir os plurais e os termos no plural deverão incluir o singular. De um modo geral, as nomenclaturas e técnicas usadas em associação com a cultura de células e tecidos, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética, química de proteínas e de ácidos nucleicos e hibridação aqui descritas são conhecidas e normalmente usadas na área. Os métodos e técnicas do presente invento são, de um modo geral, realizados de acordo com métodos convencionais conhecidos na área e como descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo da presente especificação a menos que se outra forma seja indicado. Ver, *e.g.*, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) e Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Asso-



ciates (1992), e Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). As reacções enzimáticas e as técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante, como normalmente realizado na área ou como aqui descrito. São usadas técnicas convencionais para síntese química, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação e entrega e tratamento de doentes.

Os termos que se seguem, a menos que de outra forma seja indicado, deverão ser entendidos como tendo os seguintes significados:

O termo "polipéptido" engloba proteínas nativas ou artificiais, fragmentos proteicos e análogos de polipéptidos de uma sequência proteica. Um polipéptido pode ser monomérico ou polimérico.

O termo "proteína isolada" ou "polipéptido isolado" é uma proteína ou polipéptido que, devido à sua origem ou fonte de proveniência (1) não está associado a componentes naturais que o acompanham no seu estado nativo, (2) não está contaminado com outras proteínas da mesma espécie (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente ou (4) não ocorre na natureza. Assim, um polipéptido que é sintetizado quimicamente ou sintetizado num sistema celular diferente da célula de onde deriva naturalmente estará "isolado" dos seus componentes naturais. Uma proteína pode também ser conseguida numa

forma substancialmente não contaminada com os componentes naturalmente associados através do isolamento, usando técnicas de purificação de proteínas conhecidas na área.

Uma proteína ou polipéptido é "substancialmente pura", "substancialmente homogénea" ou "substancialmente purificada" quando pelo menos cerca de 60 a 75% de uma amostra apresenta uma única espécie de polipéptido. O polipéptido ou proteína pode ser monomérica ou multimérica. Um polipéptido ou proteína substancialmente puro compreenderá, tipicamente, cerca de 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% p/p de uma amostra proteica, mais geralmente, cerca de 95% e, de preferência, será mais de 99% pura. A pureza da proteína ou homogenidade pode ser indicada por uma série de meios conhecidos na área, tais como electroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra proteica, seguido de visualização de uma única banda polipeptídica quando da coloração do gel com um corante conhecido na área. Para determinados fins, pode ser conseguida uma maior resolução usando HPLC ou outros meios conhecidos na área para purificação.

O termo "fragmento polipeptídico" como aqui usado refere-se a um polipéptido que tem uma deleção no extremo amina e/ou no extremo carboxilo, mas em que a restante sequência de aminoácidos é idêntica às posições correspondentes na sequência natural. Nalgumas formas de realização, os fragmentos têm pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento. Noutras formas de realização, os fragmentos

têm pelo menos 14 aminoácidos de comprimento, mais de preferência pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, geralmente pelo menos 50 aminoácidos de comprimento, mesmo mais de preferência pelo menos 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento.

O termo "análogo polipeptídico" como aqui usado refere-se a um polipéptido que compreende um segmento de pelo menos 25 aminoácidos que tem identidade substancial com uma porção de uma sequência de aminoácidos e que tem pelo menos uma das seguintes propriedades: (1) ligação específica a MAdCAM em condições de ligação adequadas, (2) capacidade para inibir a ligação de  $\alpha_4\beta_7$ -integrinas e/ou L-selectina a MAdCAM ou (3) capacidade para reduzir a expressão de MAdCAM na superfície celular *in vitro* ou *in vivo*. Tipicamente, os análogos de polipéptidos compreendem uma substituição de aminoácido conservada (ou inserção ou deleção) relativamente à sequência natural. Os análogos tipicamente têm pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, de preferência pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento ou mais e podem muitas vezes ter o tamanho total do polipéptido natural.

As substituições de aminoácidos preferidas são aquelas que: (1) reduzem a susceptibilidade a proteólise, (2) reduzem a susceptibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para a formação de complexos proteicos, (4) alteram a afinidade de ligação ou (5) conferem ou modificam outras propriedades físicoquímicas ou

funcionais de tais análogos. Os análogos podem incluir várias muteínas de uma sequência diferente da sequência peptídica natural. Por exemplo, substituições de um ou mais aminoácidos (de preferência substituições conservadas de aminoácidos) podem ser feitas na sequência natural (de preferência na porção do polipéptido foram dos domínios que formam contactos intermoleculares. Uma substituição de aminoácido conservada não deverá alterar substancialmente as características estruturais da sequência parental (e.g., uma substituição de aminoácido não deverá tender a partir uma hélice que ocorra na sequência parental ou a destruir outros tipos de estrutura secundária que caracteriza a sequência parental). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipéptidos reconhecidas na área estão descritos em "Proteins, Structures and Molecular Principles" (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); "Introduction to Protein Structure" (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton *et al.*, Nature, 354:105 (1991).

Na indústria farmacêutica são frequentemente usados análogos não peptídicos como fármacos com propriedades análogas às do péptido matriz. Estes tipos de compostos não peptídicos são designados "simulações de péptidos" ou "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res., 15:29(1986); Veber and Freidinger, TINS, p.392(1985); e Evans *et al.*, J. Med. Chem., 30; 1229(1987). Tais compostos são muitas vezes desenvolvidos com a ajuda de modulação molecular computarizada. As simulações de

péptidos que são estruturalmente semelhantes aos péptidos úteis em terapêutica podem ser usados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. De um modo geral, os peptidomiméticos são estruturalmente semelhantes a um polipéptido paradigma (*i.e.*, um polipéptido que tem uma propriedade bioquímica ou actividade farmacológica), como seja um anticorpo humano, mas possuem uma ou mais ligações peptídicas facultativamente substituídas por uma ligação do tipo: -CH<sub>2</sub>NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH- (cis e trans), -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>-, and -CH<sub>2</sub>SO-, por métodos conhecidos na área. A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma sequência de consenso com um D-aminoácido do mesmo tipo (*e.g.*, D-lisina em lugar de L-lisina) pode também ser usada para gerar péptidos mais estáveis. Ainda, péptidos constringidos compreendendo uma sequência de consenso ou uma variação da sequência de consenso substancialmente idêntica podem ser gerados por métodos conhecidos na área (Rizo e Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)), por exemplo, através da adição de resíduos internos de cisteína capazes de formar pontes dissulfureto intramoleculares que tornam cíclico o péptido.

Uma "imunoglobulina" é uma molécula tetramérica. Numa imunoglobulina natural, cada tetrâmero é composto por dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" (cerca de 50-70 kDa). A porção terminal amina de cada uma das cadeias inclui uma região variável de aproximadamente 100 a 110 ou mais aminoácidos responsáveis

principalmente pelo reconhecimento do antigénio. A porção terminal carboxilo de cada cadeia define uma região constante essencialmente responsável pela função efectora. As cadeias leves humanas são classificadas como cadeias  $\kappa$  e  $\lambda$ . As cadeias pesadas são classificadas como  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  ou  $\epsilon$  e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro das cadeias leves e pesadas, as regiões variáveis e constantes são ligadas por uma região "J" de aproximadamente 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada incluindo também uma região "D" de aproximadamente 10 ou mais aminoácidos. Ver, de um modo geral, "Fundamental Immunology", Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). As regiões variáveis de cada par de cadeias leve/pesada formam o local de ligação do anticorpo de modo que uma imunoglobulina intacta possui dois locais de ligação.

As cadeias de imunoglobulina apresentam a mesma estrutura geral das regiões estruturais (FR) relativamente conservadas ligadas por três regiões hipervariáveis. Também designadas regiões determinantes de complementaridade ou CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par estão alinhadas pelas regiões estruturais para formar um local de ligação específico de epitopo. A partir do extremo N para o extremo C, ambas as cadeias leves e pesadas compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição dos aminoácidos a cada domínio é de acordo com as definições de Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and

1991)), ou Chothia & Leak, J. Mol. Biol., 196:901-917(1987); Chothia *et al.*, Nature, 342:878-883(1989).

Um "anticorpo" refer-se a uma imunoglobulina intacta ou a uma porção da mesma de ligação ao antígeno que compete com o anticorpo intacto para a ligação específica. Nalgumas formas de realização, um anticorpo é uma porção do mesmo de ligação ao antígeno. As porções de ligação ao antígeno podem ser produzidas por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. As porções de ligação ao antígeno incluem *inter alia*, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dAb e os fragmentos da região determinante de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia simples (scFV), anticorpos quiméricos, "diabodies" e polipéptidos que possuem pelo menos uma porção de uma imunoglobulina que é suficiente para conferir ligação específica ao antígeno. Um fragmento Fab é um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1; um fragmento F(ab)<sub>2</sub> é um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfureto na região de charneira; um fragmento Fd consiste nos domínios VH e CH1; um fragmento Fv consiste nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; e um fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature, 341:544-546(1989)) consiste num domínio VH.

Como aqui usado, um anticorpo que é referido como, *e.g.*, 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.34.2, 5.67.1, 6.77.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 ou 9.8.2, é um anticorpo monoclonal

que é produzido pelo hibridoma do mesmo nome. Por exemplo, o anticorpo 1.7.2 é produzido pelo hibridoma 1.7.2. Um anticorpo que é referido como 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod é um anticorpo monoclonal cuja sequência foi modificada a partir do correspondente anticorpo parental por mutagénese dirigida.

Um anticorpo de cadeia simples (scFv) é um anticorpo em que as regiões VL e VH estão emparelhadas para formar uma molécula monovalente através de um elemento de ligação sintético que lhes permite serem constituídas por uma única cadeia proteica (Bird *et al.*, Science, 242:423-426 (1988) e Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988)). Os diacorpos ("diabodies") são anticorpos biespecíficos bivalentes em que os domínios VH e VL são expressos numa única cadeia polipeptídica, mas usando um elemento de ligação que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando assim ao emparelhamento dos domínios com domínios complementares de uma outra cadeia e criando dois locais de ligação ao antigénio (ver, *e.g.*, Holliger, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) e Poljak, R. J., *et al.*, Structure, 2:1121-1123 (1994)). Uma ou mais CDRs de um anticorpo do invento podem ser incorporadas numa molécula, covalentemente ou não covalentemente, para formar uma imunoadesina que se liga especificamente a MAdCAM. Uma imunoadesina pode incorporar uma ou mais CDRs como parte de uma cadeia polipeptídica maior, pode ligar-se covalentemente às CDRs de uma outra cadeia



polipeptídica ou pode incorporar as CDRs não covalentemente. As CDRs permitem à imunoadesina ligar-se especificamente a um antígeno particular de interesse.

Um anticorpo pode ter um ou mais locais de ligação. Se existir mais de um local de ligação, os locais de ligação podem ser idênticos uns aos outros ou podem ser diferentes. Por exemplo, uma imunoglobulina natural possui dois locais de ligação idênticos, um anticorpo de cadeia simples ou fragmento Fab possui um local de ligação, enquanto um anticorpo "biespecífico" ou "bifuncional" (diacorpo) possui dois locais de ligação diferentes.

Um "anticorpo isolado" é um anticorpo que (1) não está associado a componentes naturais, incluindo outros anticorpos naturais, que o acompanham no seu estado nativo, (2) não está contaminado com outras proteínas da mesma espécie, (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente ou (4) não ocorre na natureza. Exemplos de anticorpos isolados produzidos por um hibridoma ou outra linha celular *in vitro*, é um anticorpo humano anti-MAdCAM derivado de um mamífero ou planta transgênica.

Como aqui usado, o termo "anticorpo humano" significa um anticorpo em que as sequências da região variável e constante são sequências humanas. O termo inclui anticorpos com sequências derivadas de genes humanos, mas que foram alterados, *e.g.*, para diminuir a possível imunogenicidade, aumentar a afinidade, eliminar cisteínas

ou locais de glicosilação que possam causar enrolamento indesejável, etc. O termo inclui anticorpos como os produzidos por via recombinante em células não humanas, os quais podem conferir glicosilação não típica de células humanas. O termo também inclui anticorpos que foram induzidos num murganho transgênico que compreende parte ou a totalidade dos loci das cadeias pesada e leve de imunoglobulina humana.

Num aspecto, o invento proporciona um anticorpo humanizado. Nalgumas formas de realização, o anticorpo humanizado é um anticorpo que deriva de uma espécie não humana, no qual determinados aminoácidos nos domínios estruturais e constante das cadeias pesadas e leve foram alterados de forma a evitar ou abolir uma resposta imune em seres humanos. Nalgumas formas de realização, um anticorpo humanizado pode ser produzido através da fusão dos domínios constantes de um anticorpo humano com os domínios variáveis de uma espécie não humana. Exemplos de como produzir anticorpos humanizados podem ser encontrados nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 6054297, 5886152 and 5877293. Nalgumas formas de realização, um anticorpo humanizado anti-MAdCAM do invento compreende a sequência de aminoácidos de uma ou mais regiões estruturais de um ou mais anticorpos anti-MAdCAM do invento.

Num outro aspecto, o invento inclui um "anticorpo quimérico". Nalgumas formas de realização, o anticorpo quimérico refere-se a um anticorpo que possui uma ou mais

regiões de um anticorpo e uma ou mais regiões de um ou mais de outros anticorpos. Numa forma de realização preferida, uma ou mais das CDRs derivam de um anticorpo humano anti-MAdCAM do invento. Numa forma de realização mais preferida, a totalidade das CDRs derivam de um anticorpo humano anti-MAdCAM do invento. Numa outra forma de realização preferida, as CDRs de um ou mais anticorpos humanos anti-MAdCAM do invento são misturadas e emparelhadas num anticorpo quimérico. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode compreender uma CDR1 da cadeia leve de um primeiro anticorpo humano anti-MAdCAM pode ser combinada com CDR2 e CDR3 da cadeia leve de um segundo anticorpo humano anti-MAdCAM e as CDRs da cadeia pesada podem derivar de um terceiro anticorpo anti-MAdCAM. Ainda, as regiões estruturais podem derivar de um dos mesmos anticorpos anti-MAdCAM, de um ou mais anticorpos diferentes, tais como um anticorpo humano ou de um anticorpo humanizado.

Um "anticorpo neutralizante", "um anticorpo inibidor" ou anticorpo antagonista é um anticorpo que inibe a ligação de  $\alpha_4\beta_7$  ou de células que expressam  $\alpha_4\beta_7$  ou qualquer outro ligando cognato ou células que expressam o ligando cognato, a MAdCAM em pelo menos cerca de 20%. Numa forma de realização preferida, o anticorpo reduz ou inibe a ligação da integrina  $\alpha_4\beta_7$  ou de células que expressam  $\alpha_4\beta_7$  a MAdCAM em pelo menos 40%, mais de preferência em 60%, mesmo mais de preferência em 80%, 85%, 90%, 95% ou 100%. A redução da ligação pode ser medida por quaisquer meios conhecidos dos familiarizados com a área, por exemplo,

conforme medido num ensaio *in vitro* de ligação competitiva. Um exemplo de medição da redução na ligação de células que expressam  $\alpha_4\beta_7$  a MAdCAM está apresentado no Exemplo 1.

Fragmentos ou análogos de anticorpos podem ser facilmente preparados pelos familiarizados com a área seguindo os ensinamentos desta especificação. Os extremos amina e carboxilo preferidos de fragmentos ou análogos correm perto das fronteiras de domínios funcionais. Os domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados de sequências nucleotídicas e/ou de aminoácidos com bases de dados públicas ou proprietárias. De preferência, são usados métodos de comparação computarizados para identificar motivos de sequências ou domínios conformacionais previstos para a proteína que ocorrem noutras proteínas de estrutura e/ou função conhecida. Os métodos para identificar sequências proteicas que se enrolam numa estrutura tridimensional conhecida são conhecidos (Bowie *et al.*, Science, 253:164 (1991)).

O termo "ressonância de plasmões de superfície", como aqui usado, refere-se a um fenómeno óptico que permite a análise de interacções biospecíficas em tempo real através da detecção de alterações nas concentrações proteicas dentro de uma matriz de biosensor, por exemplo, usando o sistema BIAcore (Pharmacia, Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Para outras descrições, ver Jonsson, U., *et al.*, Ann. Biol. Clin., 51:19-26 (1993); Jonsson, U., *et al.*, Biotechniques, 11:620-627 (1991);

Johnsson, B., *et al.*, J. Mol. Recognit., 8:125-131 (1995);  
e Johnsson, B., *et al.*, Anal. Biochem., 198:268-277 (1991).

O termo " $k_{off}$ " refere-se à constante da velocidade de dissociação para a dissociação de um anticorpo do complexo anticorpo/antigénio.

O termo " $k_d$ " refere-se à constante de dissociação em equilíbrio de uma interacção particular antigénio-anticorpo. Um anticorpo é dito como se ligando a um antigénio quando a constante de dissociação é  $\leq 1 \mu M$ , de preferência  $\leq 100 \text{ nM}$  e mais de preferência  $\leq 10 \text{ nM}$ .

O termo "epitopo" inclui qualquer determinante proteico capaz de se ligar especificamente a uma imunoglobulina ou receptor de células T ou de outra forma interagir com uma molécula. Os determinantes epitópicos geralmente consistem em grupos de moléculas quimicamente activos na superfície, tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e, geralmente, possuem características tridimensionais específicas, assim como características de carga específicas. Um epitopo pode ser "linear" ou "conformacional". Num epitopo linear, a totalidade dos pontos de interacção entre a proteína e a molécula de interacção (como seja um anticorpo) ocorre linearmente ao longo da sequência de aminoácidos primária da proteína. Num epitopo conformacional, os pontos de interacção ocorrem ao longo dos resíduos de aminoácidos na proteína que estão separados uns dos outros.

Como aqui usado, os vinte aminoácidos convencionais e as suas abreviaturas seguem a utilização convencional. Ver, "Immunology - A Synthesis" (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Os estereoisómeros (*e.g.*, D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, os aminoácidos não naturais tais como aminoácidos  $\alpha$ -,  $\alpha$ -di-substituídos e N-alkil-aminoácidos, ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais podem ser componentes adequados para os polipéptidos do presente invento. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4-hidroxipropilina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetil-lisina,  $\epsilon$ -N-acetil-lisina, O-fosfo-serina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxi-lisina, s-N-metilarginina e outros aminoácidos semelhantes (*e.g.*, 4-hidroxiprolina). Na notação de polipéptidos aqui usada, a direcção para a esquerda é a direcção do extremo amina e a direcção para a direita é a direcção do extremo carboxilo, de acordo com a utilização e convenção convencionais.

O termo "polinucleótido" como aqui referido significa uma forma polimérica de nucleótidos de pelo menos 10 bases de comprimento, ribonucleótidos ou desoxirribonucleótidos ou uma forma modificada de qualquer um dos tipos de nucleótidos. O termo inclui formas de DNA de cadeia simples e de cadeia dupla.

O termo "polinucleótido isolado" como aqui usado

deverá significar um polinucleótido de origem genômica, de cDNA ou sintético ou alguma combinação destes, em que devido à sua origem o "polinucleótido isolado" (1) não está associado à totalidade ou a uma parte de um polinucleótido em que o "polinucleótido isolado" é encontrado na natureza, (2) está operacionalmente ligado a um polinucleótido a que não está ligado na natureza ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior.

O termo "oligonucleótido" aqui referido inclui nucleótidos naturais e modificados ligados uns aos outros por ligações oligonucleotídicas naturais e não naturais. Os oligonucleótidos são uma subsérie de polinucleótidos geralmente compreendendo 200 bases ou menos. De preferência os oligonucleótidos possuem 10 a 60 bases de comprimento e mais de preferência 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 a 40 bases de comprimento. Os oligonucleótidos são geralmente de cadeia simples, *e.g.*, para sondas; ainda que os oligonucleótidos possam ser de cadeia dupla, *e.g.*, para usar na construção de um gene mutante. Os oligonucleótidos do invento podem ser oligonucleótidos com sentido ou anti-sentido.

O termo "nucleótidos naturais" aqui referidos inclui desoxirribonucleótidos e ribonucleótidos. O termo "nucleótidos modificados" aqui referido inclui nucleótidos com grupos de açúcar modificados ou substituídos e similares. O termo "ligações oligonucleotídicas" aqui referido inclui ligações oligonucleotídicas tais como fosforo-

tioato, fosforoditioato, fosforo-selenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato e similares. Ver, e.g., LaPlanche *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein *et al.*, Nucl. Acids Res., 16:3209(1988); Zon *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 6:539(1991); Zon *et al.*, "Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach", pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England(1991)); Stec *et al.*, Patente U.S. No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews, 90:543(1990). Um oligonucleótido pode incluir, caso se pretenda, uma marca para detecção.

Sequências "ligadas operacionalmente" incluem sequências de controlo da expressão que são contíguas com o gene de interesse e sequências de controlo da expressão que actuam *em trans* ou a alguma distância para controlar o gene de interesse. O termo "sequência de controlo da expressão" como aqui usado refere-se a sequências polinucleotídicas que são necessárias para efectuar a expressão e processamento de sequências codificadoras a que estão ligadas. As sequências de controlo da expressão incluem sequências adequadas de iniciação e terminação da transcrição, promotores e estimuladores; sinais de processamento eficiente de RNA tais como sinais de "splicing" e de poliadenilação; sequências que estabilizam o mRNA citoplasmático; sequências que aumentam a eficiência da tradução (*i.e.*, sequência de consenso Kozak); sequências que aumentam a estabilidade das proteínas; e quando pretendido, sequências que aumentam



a secreção de proteína. A natureza de tais sequências de controlo difere dependendo do organismo hospedeiro; nos procariotas, tais sequências de controlo geralmente incluem promotor, local de ligação ao ribossoma e sequência de terminação da transcrição; nos eucariotas, de um modo geral, tais sequências de controlo incluem promotores e sequências de terminação da transcrição. O termo "sequências de controlo" pretende incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é essencial para a expressão e processamento e pode também incluir componentes adicionais cuja presença seja vantajosa, por exemplo, sequências líder e sequências parceiras de fusão.

O termo "vector", como aqui usado, destina-se a referir uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar uma outra molécula a que esteja ligada. Um tipo de vector é um "plasmídeo", que se refere a uma ansa de DNA de cadeia dupla circular no qual segmentos de DNA adicionais possam ser ligados. Um outro tipo de vector é um vector viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados ao genoma viral. Determinados vectores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira na qual são introduzidos (e.g., vectores bacterianos tendo uma origem de replicação bacteriana e vectores epissomais de mamífero). Outros vectores (e.g., vectores de mamífero não epissómicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira quando da introdução na célula hospedeira e assim são replicados juntamente com o genoma hospedeiro. Ainda, determinados vectores são capazes de dirigir a expressão de genes aos

quais estão operacionalmente ligados. Tais vectores são aqui referidos como "vectores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vectores de expressão"). Em geral, os vectores de expressão úteis nas técnicas de DNA recombinante são muitas vezes na forma de plasmídeos. Na presente especificação, "plasmídeo" e "vector" podem ser usados indiferentemente uma vez que o plasmídeo é a forma de vector mais frequentemente usada. No entanto, o invento destina-se a incluir outras formas de vectores de expressão, tais como vectores virais (e.g., retrovírus defectivos para a replicação, adenovírus e vírus adeno-associados) os quais servem funções equivalentes.

O termo "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), como aqui usado, destina-se a referir uma célula na qual um vector de expressão recombinante tenha sido introduzido. Deve ser entendido que tais termos se destinam a referir não só a célula individual particular como a progénie de tal célula. Devido a determinadas modificações puderem ocorrer nas gerações sucessivas devido a mutação ou a influências ambientais, tal progénie pode de facto não ser idêntica à célula parental, mas ainda estão incluídas dentro do âmbito do termo "célula hospedeira" como aqui usado.

O termo "hibrida selectivamente" aqui referido significa que se liga de forma detectável e especificamente. Polinucleótidos, oligonucleótidos e fragmentos dos mesmos de acordo com o invento hibridam selectivamente com

cadeias de ácido nucleico em condições de hibridação e lavagem que minimizam quantidades apreciáveis de ligação detectável a ácidos nucleicos não específicos. Condições de "restringência elevada" ou "altamente restritivas" podem ser usadas para se conseguir condições de hibridação selectiva como conhecido na área e aqui discutido. Um exemplo de "restringência elevada" ou condições "altamente restritivas" é um método de incubação de um polinucleótido com um outro polinucleótido, em que um polinucleótido pode ser fixado a uma superfície sólida, como seja uma membrana, num tampão de hibridação de SSPE ou SSC 6X, 50% de formamida, reagente de Denhardt 5X, 0,5% SDS, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão fragmentado desnaturado a uma temperatura de hibridação de 42°C durante 12-16 horas, seguido de duas lavagens a 55°C usando um tampão de lavagem de SSC 1X, 0,5% SDS.

O termo "percentagem de identidade de sequências" no contexto de sequências nucleotídicas refere-se aos resíduos em duas sequências que são os mesmos quando alinhados para correspondência máxima. O comprimento da comparação de identidade de sequências pode ser um segmento de pelo menos cerca de nove nucleótidos, geralmente pelo menos cerca de 18 nucleótidos, mais geralmente pelo menos cerca de 24 nucleótidos, tipicamente pelo menos cerca de 28 nucleótidos, mais tipicamente pelo menos cerca de 32 nucleótidos e, de preferência pelo menos cerca de 36, 48 ou mais nucleótidos. Existe uma série de diferentes algoritmos conhecidos na área que podem ser usados para medir a

identidade de sequências. Por exemplo, as sequências polinucleotídicas podem ser comparadas usando FASTA, Gap ou Bestfit, os quais são programas do pacote Wisconsin Versão 10.3, Accelrys, San Diego, CA. FASTA que inclui, *e.g.*, o programa FASTA2 e FASTA3, proporciona alinhamentos e percentagem de identidade de sequências das regiões da melhor sobreposição entre a sequência a analisar e sequências de pesquisa (Pearson, *Methods Enzymol.*, 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 132: 185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.*, 266: 227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.*, 276: 71-84 (1998)).

A menos que de outra forma seja especificado, são usados os parâmetros por defeito de um programa ou algoritmo particular. Por exemplo, a percentagem de identidade de sequências entre sequências nucleotídicas pode ser determinada usando FASTA com os seus parâmetros por defeito (um tamanho de palavra de 6 e o factor NOPAM para a matriz de pontuação) ou usando Gap com os seus parâmetros por defeito conforme proporcionado no Pacote Wisconsin Versão 10.3.

Uma referência a uma sequência nucleotídica engloba o seu complemento a menos que de outra forma seja especificado. Assim, uma referência a uma molécula de ácido nucleico tendo uma sequência particular deverá ser entendida para incluir a sua cadeia complementar, com a sua sequência complementar.

No campo da biologia molecular, os investigadores usam indiscriminadamente os termos "percentagem de identidade de sequências", "percentagem de similaridade de sequências" e "percentagem de homologia de sequências". Neste pedido de patente, estes termos deverão ter o mesmo significado relativamente às sequências nucleotídicas apenas.

O termo "similaridade substancial" ou "similaridade de sequências substancial", quando se refere a um ácido nucleico ou um seu fragmento, indica que quando optimamente alinhado, com inserções ou deleções nucleotídicas adequadas, com um outro ácido nucleico (ou sua cadeia complementar), existe identidade de sequências nucleotídicas em pelo menos cerca de 85%, de preferência pelo menos cerca de 90% e mais de preferência pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das bases nucleotídicas, conforme medido por qualquer algoritmo conhecido de identidade de sequências, tais como FASTA, BLAST ou Gap, como discutido atrás.

Como aplicado a polipéptidos, o termo "identidade substancial" significa que as duas sequências peptídicas, quando optimamente alinhadas, como seja pelo programa GAP ou BESTFIT usando pesos de espaços por defeito, partilham pelo menos 75% ou 80% de identidade de sequências, de preferência pelo menos 90% ou 95% de identidade de sequências, mesmo mais de preferência pelo menos 98% ou 99% de identidade de sequências. De preferência, as posições

dos resíduos que não são idênticas diferem em substituições de aminoácidos conservadas. Uma "substituição de aminoácidos conservada" é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por um outro resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas semelhantes (*e.g.*, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservada não alterará substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos diferem uma da outra em substituições conservadas, a percentagem de identidade de sequências ou grau de similaridade pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservada da substituição. Os meios para fazer este ajuste são conhecidos dos familiarizados com a área. Ver, *e.g.*, Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 24: 307-31 (1994). Exemplos de grupos de aminoácidos que possuem cadeias laterais com propriedades químicas semelhantes incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadeias laterais hidroxilo alifáticas: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; e 6) cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. São descritas grupos de substituições de aminoácidos conservadas: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina.

Como alternativa, uma substituição conservada é qualquer alteração tendo um valor positivo na matriz de verosimilhança log PAM250 descrita em Gonnet *et al.*, Science, 256: 1443-45 (1992). Uma substituição "moderadamente conservada" é qualquer alteração tendo um valor não negativo na matriz de verosimilhança log PAM250.

A similaridade de sequências para os polipéptidos é tipicamente medida usando programas de análise de sequências. Os programas de análise de proteínas fazem corresponder sequências semelhantes usando medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições de aminoácidos conservadas. Por exemplo, GCG contém programas tais como "Gap" e "Bestfit" que podem ser usados com parâmetros por defeito para determinar homologia de sequências ou identidade de sequências entre polipéptidos estreitamente relacionados, tais como polipéptidos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína selvagem e uma sua muteína. Ver, *e.g.*, o pacote Wisconsin Versão 10.3. As sequências polipeptídicas põem também ser comparadas usando FASTA usando parâmetros por defeito ou recomendados, um programa do pacote Wisconsin Versão 10.3. FASTA (*e.g.*, FASTA2 e FASTA3) proporciona alinhamentos e percentagem de identidade de sequências das regiões da melhor sobreposição entre as sequências a analisar e de pesquisa (Pearson (1990); Pearson (2000)). Um outro algoritmo preferido quando da comparação de uma sequência do invento com uma base de dados contendo um grande número de sequências de

diferentes organismos é o programa de computador BLAST, especialmente *blatp* ou *tblastn*, usando parâmetros por defeito. Ver, *e.g.*, Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990); Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-402 (1997).

O comprimento das sequências polipeptídicas comparadas relativamente a homologia terá pelo menos cerca de 16 resíduos de aminoácidos, geralmente pelo menos cerca de 20 resíduos, mais geralmente pelo menos cerca de 24 resíduos, tipicamente pelo menos cerca de 28 resíduos e, de preferência, mais de cerca de 35 resíduos. Quando da pesquisa de uma base de dados contendo sequências de um grande número de organismos diferentes, é preferível comparar sequências de aminoácidos.

Como aqui usado, os termos "marca" ou "marcado" refere-se à incorporação de uma outra molécula no anti-corpo. Numa forma de realização, a marca é uma marca detectável, *e.g.*, incorporação de um aminoácido marcado radioactivamente ou ligação a um polipéptido de grupos biotinilo que podem ser detectados por avidina marcada (*e.g.*, estreptavidina contendo uma marca fluorescente ou actividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou colorimétricos). Numa outra forma de realização, a marca pode ser terapêutica, *e.g.*, um conjugado de fármaco ou toxina. Vários métodos de marcação de polipéptidos e glicoproteínas são conhecidos na área e podem ser usados.



Exemplos de marcas para polipéptidos incluem, mas não estão limitados ao seguinte: isótopos radioactivos ou radionuclídeos (e.g.,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), marcas fluorescentes (e.g., FITC, rodamina, lantanídeos fosforoso), marcas enzimáticas (e.g., peroxidase de rábano silvestre,  $\beta$ -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), marcadores quimioluminescentes, grupos biotini-  
lo, epitopos polipeptídicos pré-determinados reconhecidos por um repórter secundário (e.g., sequências de de fechos de leucina, locais de ligação a anticorpos secundários, domínios de ligação a metais, marcas de epitopos), agentes magnéticos, tais como quelatos de gadolínio, toxinas tais como toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidroxi antracina-9,10-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaina, propranolol e puomicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Nalgumas formas de realização, as marcas são ligadas através de braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir potencial obstrução estérica.

O termo "agente" é aqui usado para significar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extracto preparado a partir de materiais biológicos. O termo "agente ou droga farmacêutica" como aqui usado refere-se a um composto

químico ou composição capaz de induzir um efeito terapêutico pretendido quando adequadamente administrado a um doente. Outros termos químicos são aqui usados de acordo com a utilização convencional na área, conforme exemplificado por "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms" (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

O termo agente "anti-inflamatório" ou "imunomodulador" é aqui usado para referir agentes que possuem a propriedade funcional de inibição da inflamação, incluindo doença inflamatória num indivíduo, incluindo num ser humano. Em várias formas de realização deste invento, a doença inflamatória pode ser mas não está limitada a doenças inflamatórias do trato gastrointestinal incluindo doença de Crohn, colite ulcerativa, doença de divertículos, gastrite, doença hepática, esclerose biliar primária, colangite esclerosante. Doenças inflamatórias também incluem mas não estão limitadas a doença abdominal (incluindo peritonite, apendicite, doença do trato biliar), mielite transversa aguda, dermatite alérgica (incluindo pele alérgica, eczema alérgica, atopia da pele, eczema atópico, dermatite atópica, inflamação cutânea, eczema inflamatória, dermatite inflamatória, dermatite por pulgas, dermatite miliar, eczema miliar, dermatite por ácaros do pó da casa), espondilite anquilosante (síndrome de Reiters), asma, inflamação das vias aéreas, aterosclerose, arteriosclerose, atresia biliar, inflamação da bexiga, cancro da mama, inflamação cardiovascular (incluindo vasculite, manchas reumatóides à volta das unhas, úlceras das pernas,

polimiosite, inflamação vascular crónica, pericardite, doença pulmonar obstrutiva crónica), pancreatite crónica, inflamação perineural, colite (incluindo colite amoébia, colite infecciosa, colite bacteriana, colite de Crohn, colite isquémica, colite ulcerativa, proctocolite idiopática, doença inflamatória intestinal, colite pseudomembranosa), distúrbios vasculares de colagénio (artrite reumatóide, SLE, esclerose sistémica progressiva, doença do tecido conjuntivo misto, diabetes mellitus), doença de Crohn (enterite regional, ileite granulomatosa, ileocolite, inflamação do sistema digestivo), doença desmielinizante (incluindo mielite, esclerose múltipla, esclerose disseminada, encefalomielite disseminada aguda, desmielinização perivenosa, deficiência em vitamina B12, síndrome de Guillain-Barre, retrovírus associado a MS), dermatomiosite, diverticulite, diarreia exudativa, gastrite, hepatite granulomatosa, inflamação granulomatosa, colecistite, diabetes mellitus dependente de insulina, doenças inflamatórias do fígado (cirrose biliar primária com fibrose hepática, hepatite, colangite esclerosante), inflamação do pulmão (fibrose pulmonar idiopática, granuloma eosinofílico do pulmão, hsiotiocitose pulmonar X, inflamação peribronquiolar, bronquite aguda), linfogranuloma venéreo, melanoma maligno, doença da boca/dentes (incluindo gengivite, doença periodontal), mucosite, inflamação do sistema musculoesquelético (miosite), esteato-hepatite não alcoólica (doença do fígado gordo não alcoólica), inflamação ocular & orbital (incluindo uveíte, neurite óptica, ulceração reumatóide periférica, inflamação da córnea periférica), osteoartrite,

osteomielite, inflamação da faringe, poli-artrite, proctite, psoríase, lesão por radiação, sarcoidose, necropatia das células falsiformes, tromboflebite superficial, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, tiroidite, lúpus eritematoso sistêmico, doença do enxerto versus hospedeiro, lesão aguda de queimadura, síndrome de Behçet, síndrome de Sjögren.

Os termos doente e indivíduo incluem indivíduos humanos e animais.

Anticorpos humanos anti-MAdCAM e sua caracterização

São descritos anticorpos anti-MAdCAM compreendendo sequências CDR humanas. São descritos anticorpos humanos anti-MAdCAM. Nalgumas descrições, os anticorpos humanos anti-MAdCAM são produzidos através da imunização de um animal transgênico não humano, *e.g.*, um roedor, cujo genoma compreende genes de imunoglobulina humana de forma que o animal transgênico produz anticorpos humanos. Nalgumas descrições, o anticorpo anti-MAdCAM não se liga ao complemento.

Numa descrição o anticorpo anti-MAdCAM é 7.16.6. Numa outra descrição, o anticorpo anti-MAdCAM compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir de SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24,

28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66 ou 68 (com ou sem a sequência sinal) ou a região variável de qualquer uma das referidas sequências de aminoácidos ou uma ou mais CDRs destas sequências de aminoácidos. Numa outra descrição, o anticorpo anti-MAdCAM compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ou 64 (com ou sem a sequência sinal) ou a sequência de aminoácidos da região variável, ou de uma ou mais CDRs das referidas sequências de aminoácidos. São igualmente descritos anticorpos humanos anti-MAdCAM compreendendo a sequência de aminoácidos do começo da CDR1 até ao fim da CDR3 de qualquer uma das sequências atrás mencionadas. É ainda descrito um anticorpo anti-MAdCAM compreendendo uma ou mais regiões FR de qualquer uma das sequências atrás mencionadas.

É ainda descrito um anticorpo anti-MAdCAM compreendendo uma das sequências de aminoácidos atrás mencionadas em que foram feitas uma ou mais modificações. Nalgumas descrições, as cisteínas no anticorpo, que podem ser quimicamente reactivas, são substituídas com um outro resíduo, como seja, sem limites, alanina ou serina. Numa descrição, a substituição é numa cisteína não canónica. A substituição pode ser feita numa CDR ou numa região estrutural de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. Nalgumas descrições, a cisteína é canónica.

Nalgumas descrições, uma substituição de amino-ácido é feita para eliminar potenciais locais proteolíticos no anticorpo. Tais locais podem ocorrer numa CDR ou uma região estrutural de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. A substituição de resíduos de cisteína e a remoção de locais proteolíticos pode diminuir a heterogeneidade no produto anticorpo. Nalgumas descrições, os pares de asparagina-glicina, que formam potenciais locais de desamidação, são eliminados através da alteração de um ou de ambos os resíduos. Nalgumas descrições, uma substituição de aminoácidos é feita para adicionar ou para remover potenciais locais de glicosilação na região variável de um anticorpo od invento.

Nalgumas descrições, a lisina C-terminal da cadeia pesada do anticorpo anti-MAdCAM do invento é clivada. Em várias descrições, as cadeias pesadas e leves dos anticorpos anti-MAdCAM podem, facultativamente incluir uma sequência sinal.

Doze anticorpos monoclonais humanos inibidores anti-MAdCAM e as linhas celulares de hibridoma que os produzem estão descritos na Tabela 1 que apresenta os identificadores das sequências (SEQ ID NO:) dos ácidos nucleicos codificadores das cadeias pesadas e leves de tamanho completo (incluindo sequências sinal) e as correspondentes sequências de aminoácidos deduzidas de tamanho completo.

Tabela 1

| ANTICORPOS HUMANOS ANTI-MAdCAM |                                        |          |      |          |
|--------------------------------|----------------------------------------|----------|------|----------|
| Anticorpo monoclonal           | IDENTIFICADOR DA SEQUÊNCIA (SEQ ID NO) |          |      |          |
|                                | Tamanho completo                       |          |      |          |
|                                | Pesada                                 |          | Leve |          |
|                                | DNA                                    | Proteína | DNA  | Proteína |
| 1.7.2                          | 1                                      | 2        | 3    | 4        |
| 1.82                           | 5                                      | 6        | 7    | 8        |
| 6.14.2                         | 9                                      | 10       | 11   | 12       |
| 6.22.2                         | 13                                     | 14       | 15   | 16       |
| 6.34.2                         | 17                                     | 18       | 19   | 20       |
| 6.67.1                         | 21                                     | 22       | 23   | 24       |
| 6.73.2                         | 25                                     | 26       | 27   | 28       |
| 6.77.1                         | 29                                     | 30       | 31   | 32       |
| 7.16.6                         | 33                                     | 34       | 35   | 36       |
| 7.20.5                         | 37                                     | 38       | 39   | 40       |
| 7.26.4                         | 41                                     | 42       | 43   | 44       |
| 9.8.2                          | 45                                     | 46       | 47   | 48       |

Na Tabela 2 está descrita uma versão modificada de determinados anticorpos monoclonais humanos anti-MAdCAM atrás identificados com os identificadores das sequências para as sequências de DNA e de proteína dos anticorpos modificados.

Tabela 2

| ANTICORPOS HUMANOS ANTI-MAdCAM     |                                        |          |      |          |
|------------------------------------|----------------------------------------|----------|------|----------|
| Anticorpo monoclonal<br>modificado | IDENTIFICADOR DA SEQUÊNCIA (SEQ ID NO) |          |      |          |
|                                    | Tamanho completo                       |          |      |          |
|                                    | Pesada                                 |          | Leve |          |
|                                    | DNA                                    | Proteína | DNA  | Proteína |
| 6.22.2-mod                         | 51                                     | 52       | 53   | 54       |
| 6.34.2-mod                         | 55                                     | 56       | 57   | 58       |
| 6.67.1-mod                         | 59                                     | 60       | 61   | 62       |
| 6.77.1-mod                         | 63                                     | 64       | 65   | 66       |
| 7.26.4-mod                         | 41                                     | 42       | 67   | 68       |

*Classe e subclasse de anticorpos anti-MAdCAM*

O anticorpo pode ser uma molécula de IgG, IgM, IgE, IgA ou IgD. Numa descrição, o anticorpo é da classe IgG e é da subclasse IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> ou IgG<sub>4</sub>. Numa descrição, o anticorpo anti-MAdCAM é o",c.. <, -""7 da subclasse IgG<sub>2</sub> ou IgG<sub>4</sub>. Numa descrição, o anticorpo anti-MAdCAM é da mesma classe e subclasse dos anticorpos 1.7.2,1.8.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod que é IgG<sub>z</sub>, ou 6.14.2.6.22.2.6.34.2,6.67.1, 6.73.2.6.77.1 ou 9.8.2, que é IgG<sub>4</sub>.

A classe e subclasse de anticorpos anti-MAdCAM podem ser determinadas por qualquer método conhecido na



área. Em geral, a classe e subclasse de um anticorpo pode ser determinada usando anticorpos que são específicos para uma classe e subclasse particulares de anticorpo. Tais anticorpos podem ser adquiridos comercialmente. Como alternativa, a classe e subclasse podem ser determinadas por sequenciação da totalidade ou de uma parte dos domínios constantes das cadeias pesada e/ou leve dos anticorpos, comparando as suas sequências de aminoácidos com sequências de aminoácidos conhecidas de várias classes e subclasses de imunoglobulinas e determinação da classe e subclasse dos anticorpos como a classe que apresenta a identidade de sequências mais elevada.

*Selectividade de espécie e molécula*

Numa outra descrição, o anticorpo anti-MAdCAM demonstra selectividade de espécie e de molécula. Numa descrição, o anticorpo anti-MAdCAM liga-se a MAdCAM humana, de macaco cinomolgo ou de cão. Nalgumas descrições, o anticorpo anti-MAdCAM não se liga a espécies de macacos do Novo Mundo tais como saguis. Seguindo os ensinamentos da especificação pode-se determinar a selectividade da espécie para o anticorpo anti-MAdCAM usando métodos conhecidos na área. Por exemplo, pode-se determinar a selectividade da espécie usando transferências Western, FACS, ELISA ou imuno-histoquímica. Numa descrição preferida, pode-se determinar a selectividade de espécie usando imuno-histoquímica.

Nalgumas descrições, um anticorpo anti-MAdCAM que

especificamente se liga a MAdCAM tem selectividade para MAdCAM relativamente a VCAM, fibronectina ou qualquer outro antigénio que seja pelo menos 10 vezes, de preferência pelo menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 vezes, mais de preferência pelo menos 100 vezes. Numa descrição, o anticorpo anti-MAdCAM não apresenta qualquer ligação apreciável a VCAM, fibronectina ou qualquer outro tipo de antigénio que não seja MAdCAM. Pode-se determinar a selectividade do anticorpo anti-MAdCAM para MAdCAM usando métodos conhecidos na área seguindo os ensinamentos da especificação. Por exemplo, pode-se determinar a selectividade usando transferência Western, FACS, ELISA ou imuno-histoquímica.

*Afinidade de ligação de anticorpos anti-MAdCAM para MAdCAM*

Numa descrição, os anticorpos anti-MAdCAM ligam-se especificamente a MAdCAM com elevada afinidade. Numa descrição, o anticorpo anti-MAdCAM liga-se especificamente a MAdCAM com um  $K_d$  de  $3 \times 10^{-8}$  M ou menos, conforme medido por ressonância de plasmões de superfície, como seja BIAcore. Numa descrição, o anticorpo liga-se especificamente a MAdCAM com um  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M ou menos ou  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos. Numa descrição, o anticorpo liga-se especificamente a MAdCAM com um  $K_d$  de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos. Numa outra descrição um anticorpo liga-se especificamente a MAdCAM com um  $K_d$  de  $2,35 \times 10^{-11}$  M ou menos ou  $9 \times 10^{-12}$  M ou menos. Numa outra descrição, o anticorpo liga-se especificamente a MAdCAM com um  $K_d$  de  $1 \times 10^{-11}$  M ou menos. Numa outra

descrição, o anticorpo liga-se especificamente a MAdCAM com substancialmente o mesmo  $K_d$  de um anticorpo seleccionado de entre 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Um anticorpo com "substancialmente o mesmo  $K_d$ " do anticorpo de referência possui um  $K_d$  que é  $\pm 100$  pM, mais de preferência  $\pm 50$  pM, mais de preferência  $\pm 20$  pM, ainda mais de preferência  $\pm 10$  pM,  $\pm 5$  pM ou  $\pm 2$  pM, comparado com o  $K_d$  do anticorpo de referência na mesma experiência. Numa outra descrição, o anticorpo liga-se a MAdCAM com substancialmente o mesmo  $K_d$  de um anticorpo que compreende um ou mais domínios variáveis ou uma ou mais CDRs de um anticorpo seleccionado de entre 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Ainda numa outra descrição, o anticorpo liga-se a MAdCAM com substancialmente o mesmo  $K_d$  de um anticorpo que compreende uma das sequências de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ou 68 (com ou sem a sequência sinal) ou o seu domínio variável. Numa outra descrição, o anticorpo liga-se a MAdCAM com substancialmente o mesmo  $K_d$  de um anticorpo que compreende uma ou mais CDRs de um anticorpo que compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ou 68.

A afinidade de ligação de um anticorpo anti-MAdCAM a MAdCAM pode ser determinada por qualquer método conhecido na área. Numa descrição, a afinidade de ligação pode ser medida por ELISAs competitivos, RIAS ou ressonância de plasmões de superfície, como seja BIAcore. Numa outra descrição, a afinidade de ligação é medida por ressonância de plasmões de superfície. Numa outra descrição, a afinidade de ligação e a velocidade de dissociação é medida usando um BIAcore. Um exemplo de determinação da afinidade de ligação está descrita abaixo no Exemplo II.

*Semi-vida de anticorpos anti-MAdCAM*

De acordo com um outro objectivo da descrição, o anticorpo anti-MAdCAM tem uma semi-vida de pelo menos um dia *in vitro* ou *in vivo*. Numa descrição, o anticorpo ou parte dele tem uma semi-vida de pelo menos três dias, o anticorpo ou parte dele tem uma semi-vida de quatro ou mais dias. Numa outra descrição, o anticorpo ou parte dele tem uma semi-vida de oito dias ou mais. Numa outra descrição, o anticorpo ou porção de ligação ao antigénio do mesmo é derivatizado ou modificado de forma que possui uma semi-vida mais longa, como descrito abaixo. Numa outra descrição, o anticorpo pode conter mutações pontuais para aumentar a semi-vida no soro, como descrito em WO 00/09560, publicado em 24 de Fevereiro, 2000.

A semi-vida do anticorpo pode ser medida por

quaisquer meios conhecidos dos familiarizados com a matéria. Por exemplo, a semi-vida do anticorpo pode ser medida por transferência Western, ELISA ou RIA durante um período de tempo adequado. A semi-vida dos anticorpos pode ser medida num animal adequado, como seja um primata, e.g., macaco cinomolgo, ou um ser humano.

*Identificação de epitopos de MAdCAM reconhecidos por anticorpo Anti-MAdCAM*

É igualmente descrito um anticorpo anti-MAdCAM humano que se liga ao mesmo antigénio ou epitopos que um anticorpo anti-MAdCAM humano aqui proporcionado. Ainda, é descrito um anticorpo anti-MAdCAM humano que compete ou compete de forma cruzada com um anticorpo anti-MAdCAM humano. Numa descrição, o anticorpo anti-MAdCAM humano é 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, o anticorpo anti-MAdCAM humano compreende um ou mais domínios variáveis ou uma ou mais CDRs de um anticorpo seleccionado entre 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod or 7.26.4-mod. Ainda noutra descrição, o anticorpo anti-MAdCAM humano compreende uma das sequências de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 or 68 (com ou sem a sequência sinal) ou

um seu domínio variável. Numa outra descrição, o anticorpo anti-MAdCAM humano compreende uma ou mais CDRs de um anticorpo que compreende uma das sequências de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ou 68. Numa descrição altamente preferida, o anticorpo anti-MAdCAM é um outro anticorpo humano.

Pode-se determinar se um anticorpo anti-MAdCAM se liga ao mesmo antígeno que um outro anticorpo anti-MAdCAM para capturar o antígeno, eluir o antígeno do anticorpo anti-MAdCAM e depois determinar se o anticorpo a testar se ligará ao antígeno eluído. Pode-se determinar se um anticorpo compete com um anticorpo anti-MAdCAM através da ligação do anticorpo anti-MAdCAM a MAdCAM em condições saturantes e depois medindo a capacidade do anticorpo a testar para se ligar a MAdCAM. Se o anticorpo a testar for capaz de se ligar a MAdCAM ao mesmo tempo que o anticorpo anti-MAdCAM, então o anticorpo a testar liga-se a um epítopo diferente do anticorpo anti-MAdCAM. No entanto, se o anticorpo a testar não for capaz de se ligar a MAdCAM ao mesmo tempo, então o anticorpo a testar compete com o anticorpo anti-MAdCAM humano. Esta experiência pode ser realizada usando ELISA ou ressonância de plasmões de superfície ou, de preferência, BIAcore. Para testar se um anticorpo anti-MAdCAM competir cruzadamente com um outro anticorpo anti-MAdCAM, pode-se usar o método de competição atrás descrito em duas direcções, *i.e.* para determinar se o

anticorpo conhecido bloqueia o anticorpo a testar e vice versa.

*Utilização dos genes da cadeia leve e da cadeia pesada*

É igualmente descrito um anticorpo anti-MAdCAM que compreende uma região variável da cadeia leve codificada por um gene  $\kappa$ . Numa descrição, a região variável da cadeia leve é codificada por uma família de genes humanos  $V_{\kappa}$  A2, A3, A26, B3, 012 ou 018. Em várias descrições, a cadeia leve compreende não mais de onze, não mais de seis ou não mais de três substituições de aminoácidos relativamente à sequência germinal humana  $V_{\kappa}$  A2, A3, A26, B3, 012 ou 018. Numa descrição, as substituições de aminoácidos são substituições conservadas

SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 e 48 proporcionam as sequências de aminoácidos das cadeias leves capa de tamanho completo de doze anticorpos anti-MAdCAM, 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 e 9.8.2. As Figuras 1K-1T são alinhamentos das sequências de aminoácidos dos domínios variáveis das cadeias leves de doze anticorpos anti-MAdCAM com as sequências germinais de onde derivam. A Figura 2a mostra um alinhamento das sequências de aminoácidos dos domínios variáveis da cadeia leve das cadeias leves capa de doze anticorpos anti-MAdCAM. Seguindo os ensinamentos desta especificação, os familiarizados com a

área poderão determinar as diferenças entre as sequências germinais e as sequências de anticorpos de outros anticorpos anti-MAdCAM. SEQ ID NOS: 54, 58, 62, 66 ou 68 proporcionam as sequências de aminoácidos das cadeias leves capa de tamanho completo de cinco anticorpos anti-MAdCAM adicionais, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod, modificadas por substituição de aminoácidos relativamente aos seus anticorpos parentais anti-MAdCAM, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 ou 7.26.4, respectivamente.

Numa descrição, a VL do anticorpo anti-MAdCAM possui as mesmas mutações, relativamente à sequência de aminoácidos germinal de qualquer um ou mais das VL dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Descreve-se um anticorpo anti-MAdCAM que utiliza os mesmos genes humanos Vk e Jk de um anticorpo exemplificado. Nalgumas descrições, o anticorpo compreende uma ou mais das mesmas mutações da linha germinal como um ou mais anticorpos exemplificados. Nalgumas descrições, o anticorpo compreende diferentes substituições numa ou mais das mesmas posições de um ou mais dos anticorpos exemplificados. Por exemplo, o anticorpo anti-MAdCAM pode conter uma ou mais substituições de aminoácidos que são as mesmas presentes no anticorpo 7.16.6 e uma outra substituição de aminoácidos que é a mesma do anticorpo 7.26.4. Desta forma, pode-se misturar e emparelhar diferentes características da ligação do anticorpo de forma a alterar, e.g., a afinidade do anticorpo



para MAdCAM ou a sua velocidade de dissociação do antigénio. Noutras descrições, são feitas mutações na mesma posição das encontradas em qualquer um dos VL dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod, mas são feitas substituições de aminoácidos conservadas em vez de usar o mesmo aminoácido. Por exemplo, se a substituição de aminoácido comparada com a sequência germinal num dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod for glutamato, pode-se substituir de forma conservada por aspartato. De forma semelhante, se a substituição de aminoácido for serina, pode-se substituir de forma conservada por treonina.

Numa outra descrição, a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos que é a mesma da sequência de aminoácidos da VL de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a cadeia leve compreende as sequências de aminoácidos que são as mesmas das regiões CDR da cadeia leve de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Noutra descrição, a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos uma região CDR da

cadeia leve de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a cadeia leve compreende sequências de aminoácidos com CDRs de diferentes cadeias leves que usam os mesmos genes Vk e Jk. Numa forma de realização mais preferida, as CDRs de diferentes cadeias leves são obtidas a partir de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição preferida, a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 64, 66 ou 68 com ou sem a sequência sinal. Numa outra descrição, a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência nucleotídica seleccionada de entre SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ou 67 (com ou sem a sequência sinal) ou uma sequência nucleotídica que codifica uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou substituições de 1-11 aminoácidos. De preferência, as substituições de aminoácidos são substituições de aminoácidos conservadas. Numa outra descrição, o anticorpo ou porção da mesma compreende uma cadeia leve lambda.

É igualmente descrito um anticorpo anti-MAdCAM ou porção do mesmo que compreende uma sequência do gene VH humano ou uma sequência derivada de um gene VH. Numa descrição, a sequência de aminoácidos da cadeia pesada deriva

de uma família de genes humanos VH 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 ou 4-4. Em várias descrições, a cadeia pesada compreende não mais de quinze, não mais de seis ou não mais de três alterações de aminoácidos relativamente à sequência dos genes humanos VH 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 ou 4-4.

SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 e 46 proporcionam as sequências de aminoácidos das cadeias pesadas de tamanho completo de doze anticorpos anti-MAdCAM. As Figuras 1A-1J são alinhamentos das sequências de aminoácidos das regiões variáveis das cadeias pesadas de doze anticorpos anti-MAdCAM com as sequências germinais de onde derivam. A Figura 2B mostra os alinhamentos das sequências de aminoácidos das regiões variáveis das cadeias pesadas de doze anticorpos anti-MAdCAM. Seguindo os ensinamentos desta especificação e as sequências nucleotídicas da descrição, os familiarizados com a área podem determinar a sequência de aminoácidos codificada das doze cadeias pesadas anti-MAdCAM e as cadeias pesadas germinais e determinar as diferenças entre as sequências germinais e as sequências dos anticorpos. SEQ ID NOS: 52, 56, 60 e 64 proporcionam as sequências de aminoácidos das cadeias pesadas de tamanho completo dos anticorpos anti-MAdCAM, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod e 6.67.1-mod, modificados pela substituição de aminoácidos relativamente aos seus anticorpos parentais anti-MAdCAM, 6.22.2, 6.34.2 e 6.67.1 respectivamente. Um outro anticorpo anti-MAdCAM modificado, 7.26.4-mod, possui uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada de tamanho completo que é SEQ ID NO:42.

Numa descrição preferida, a VH do anticorpo anti-MAdCAM possui as mesmas mutações, relativamente à sequência de aminoácidos germinal, de qualquer uma ou mais das VH dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. De forma semelhante ao descrito atrás, o anticorpo compreende uma ou mais das mesmas mutações da sequência germinal de um ou mais dos anticorpos exemplificados. Nalgumas descrições, o anticorpo compreende diferentes substituições numa ou mais das mesmas posições de um ou mais dos anticorpos exemplificados. Por exemplo, o VH do anticorpo anti-MAdCAM pode conter uma ou mais substituições de aminoácidos que são as mesmas presentes no anticorpo 7.16.6 e uma outra substituição de aminoácidos que é a mesma do anticorpo 7.26.4. Desta forma, pode-se misturar e combinar diferentes características da ligação do anticorpo de forma a alterar, e.g., a afinidade do anticorpo para MAdCAM ou a sua velocidade de dissociação do antigénio. Numa outra descrição, uma substituição de aminoácidos relativamente à sequência germinal é feita na mesma posição de uma substituição relativamente à sequência germinal como encontrado em qualquer uma ou mais das VH dos anticorpos de referência 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod, mas a posição é substituída com um resíduo diferente, o qual é uma substituição conservada comparativamente com o anticorpo de referência.

Numa outra descrição, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos que é a mesma da sequência de aminoácidos da VH de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a cadeia pesada compreende sequências de aminoácidos que são as mesmas das regiões CDR da cadeia pesada de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos de pelo menos uma região CDR da cadeia pesada de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a cadeia pesada compreende as sequências de aminoácidos com CDRs de diferentes cadeias pesadas. Numa outra descrição, as CDRs de diferentes cadeias pesadas são obtidas a partir de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ou 64 com ou sem a sequência sinal. Numa outra descrição, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência nucleotídica seleccionada de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29,

33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ou 63 ou uma sequência nucleotídica que codifica uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou substituições de 1-15 aminoácidos. Numa outra descrição, as substituições são substituições de aminoácidos conservadas.

### Métodos de produção de anticorpos e linhas celulares produtoras de anticorpos

#### *Imunização*

Numa forma de realização do presente invento, são produzidos anticorpos humanos através da imunização de um animal não humano compreendendo alguns ou a totalidade dos *loci* das cadeias pesada e leve de imunoglobulina humana com um antigénio MAdCAM. Numa forma de realização preferida, o animal não humano é um animal XENOMOUSE™, o qual é uma estirpe de murganho manipulada que compreende fragmentos grandes dos *loci* de imunoglobulinas humanas e é deficiente na produção de anticorpos de murganho. Ver, e.g., Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994) e Patentes dos Estados Unidos 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 e 6130364. Ver também WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 e WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 e WO 00/037504. O animal XENOMOUSE™ produz um reportório de humano tipo adulto de anticorpos totalmente humanos e gera mAbs humanos específicos de antigénio. Uma segunda geração de animais XENOMOUSE™ possui aproximada-

mente 80% do reportório de genes V de anticorpos humanos através da introdução de fragmentos YAC com a configuração germinal com megabases de tamanho dos *loci* das cadeias pesadas e dos *loci* das cadeias leves  $\kappa$  humanas. Noutras formas de realização, o murganho XENOMOUSE™ possui aproximadamente a totalidade do *locus* da cadeia pesada e da cadeia leve  $\lambda$  humana. Ver Mendez *et al.*, Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green and Jakobovita, J. Exp. Med. 188:483-495(1998).

A descrição também proporciona um método para a preparação de anticorpos anti-MAdCAM a partir de animais não murganhos, não humanos através da imunização de animais transgênicos não humanos que compreendem os *loci* de imunoglobulinas humanas. Pode-se produzir tais animais usando os métodos descritos imediatamente atrás. Os métodos descritos nestes documentos podem ser modificados como descrito na Patente U.S. 5994619 (a "patente '619 "). A patente '619 descreve métodos para a produção de novas células em cultura da massa celular interna (CICM) e linhas celulares, derivadas de porcos e vacas e células CICM transgênicas nas quais foi introduzido DNA heterogêneo. As células transgênicas CICM podem ser usadas para produzir embriões transgênicos clonados, fetos e descendência. A patente '619 também descreve métodos de produção de animais transgênicos que são capazes de transmitir o DNA heterólogo à sua progénie. Numa forma de realização preferida, os animais não humanos podem ser ratos, ovelhas, porcos, cabras, gado bovino e cavalos.

Numa outra forma de realização, o animal não humano compreendendo *loci* de imunoglobulinas humanas são animais que possuem um "minilocus" de imunoglobulinas humanas. Na abordagem de minilocus, um *locus* de Ig exógeno é simulado através da inclusão de genes individuais do *locus* Ig. Assim, um ou mais genes VH, um ou mais genes DH, um ou mais genes JH, um ou mais domínios constantes  $\mu$  e um segundo domínio constante (de preferência um ou mais domínios constantes gama) são formados numa construção para inserção num animal. Esta abordagem está descrita, *inter alia*, nas Patentes U.S. N°5545807, 5545806, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, 5789650, 5814318, 5591669, 5612205, 5721367, 5789215, e 5643763.

Uma vantagem da abordagem de minilocus é a rapidez com que as construções incluindo porções do *locus* Ig podem ser geradas e introduzidas nos animais. No entanto, uma desvantagem potencial da abordagem de minilocus é que pode não haver diversidade suficiente de imunoglobulinas para suportar o desenvolvimento completo das células B, de forma que pode haver menos produção de anticorpos.

Para produzir um anticorpo anti-MAdCAM, um animal não humano compreendendo parte ou a totalidade dos *loci* de imunoglobulinas humanas é imunizado com um antigénio MAdCAM e um anticorpo ou célula produtora de anticorpo é isolado do animal. O antigénio MAdCAM pode ser MAdCAM isolado e/ou purificado e é preferencialmente um MAdCAM humano. Numa



outra forma de realização, o antígeno MAdCAM é um fragmento de MAdCAM, de preferência o domínio extracelular de MAdCAM. Numa outra forma de realização, o antígeno MAdCAM é um fragmento que compreende pelo menos um epitopo de MAdCAM. Numa outra forma de realização, o antígeno MAdCAM é uma célula que expressa MAdCAM na sua superfície celular, de preferência uma célula que expressa em excesso MAdCAM na sua superfície.

A imunização de animais pode ser feita por quaisquer métodos conhecidos na área. Ver, *e.g.*, Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", New York: Cold Spring Harbor Press (1990). Métodos para imunizar animais não humanos tais como murganhos, ratos, ovelhas, cabras, porcos, bovinos e cavalos são conhecidos na área. Ver, *e.g.*, Harlow and Lane e Patente dos Estados Unidos 5994619. Numa forma de realização preferida, o antígeno MAdCAM é administrado com um adjuvante para estimular a resposta imune. Tais adjuvantes incluem adjuvante completo ou incompleto de Freund, RIBI (muramildipéptidos) ou ISCOM (complexos imunostimuladores). Tais adjuvantes podem proteger o polipéptido da dispersão rápida por sequestro num depósito local ou podem conter substâncias que estimulam o hospedeiro para secretar factores que são quimiotácticos para os macrófagos e outros componentes do sistema imune. De preferência, se um polipéptido está a ser administrado, o protocolo de imunização envolverá duas ou mais administrações do polipéptido, disseminação ao longo de várias semanas.

O Exemplo 1 proporciona um protocolo para imunização de um animal XENOMOUSE™ com MAdCAM de tamanho completo em soro fisiológico tamponado com fosfatos.

*Produção de anticorpos e linhas celulares produtoras de anticorpos*

Após imunização de um animal com um antigénio MAdCAM, os anticorpos e/ou células produtoras de anticorpos pode ser obtido a partir do animal. Um soro contendo anticorpos anti-MAdCAM é obtido a partir do animal através da colheita de sangue ou sacrificando o animal. O soro pode ser usado tal como é obtido do animal, pode ser obtida uma fracção de imunoglobulinas ou os anticorpos anti-MAdCAM podem ser purificados a partir do soro.

Numa outra forma de realização, as linhas celulares imortalizadas produtoras de anticorpos podem ser preparadas a partir do animal imunizado. Após imunização, o animal é sacrificado e as células B são imortalizadas usando métodos conhecidos na área. Métodos de imortalização de células incluem, mas não estão limitadas a transfecção com oncogenes, infecção com um vírus oncogénico e cultura em condições que seleccionam células imortalizadas, exposição das células a compostos carcinogénicos ou mtagénicos, fusão com uma célula imortalizada, e.g., uma célula de mieloma, e inactivação de um gene supressor de tumor. Ver, e.g. Harlow e Lane, *supra*. Em formas de realização

envolvendo as células de mieloma, as células de mieloma não secretam polipéptidos de imunoglobulina (uma linha celular não secretória). Após imortalização e selecção com antibióticos, as células imortalizadas ou os sobrenadantes de cultura são testados usando MAdCAM, uma porção do mesmo ou uma célula que expresse MAdCAM. Numa forma de realização preferida, o rastreio inicial é efectuado com um imunoensaio ligado a enzima (ELISA) ou com um radio-imunoensaio (RIA), de preferência um ELISA. Um exemplo de ELISA é proporcionado na Publicação PCT N° WO 00/37504.

Numa outra forma de realização, as células produtoras de anticorpos podem ser preparadas a partir de um ser humano que tem uma doença autoimune e que expressa anticorpos anti-MAdCAM. As células que expressam os anticorpos anti-MAdCAM podem ser isoladas através do isolamento de leucócitos e sujeitando-os a separação de células activada por fluorescência (FACS) ou por aderência a placas revestidas com MAdCAM ou uma porção do mesmo. Estas células podem ser fundidas com um mieloma humano não secretório para produzir hibridomas humanos expressando anticorpos humanos anti-MAdCAM. Em geral, esta é uma forma de realização menos preferida devido a ser provável que os anticorpos anti-MAdCAM terem baixa afinidade para MAdCAM.

As células produtoras de anticorpos anti-MAdCAM, e.g., hibridomas, são seleccionadas, clonadas e ainda testadas relativamente a características pretendidas, incluindo um crescimento celular robusto, elevada produção

de anticorpos e características de anticorpos desejáveis, como discutido mais abaixo. Os hibridomas podem ser cultivados e expandidos *in vivo* em animais singeneicos, em animais que não possuem um sistema imune, e.g., murganhos labro, ou em culturas celulares *in vitro*. Métodos de selecção, clonagem e expansão de hibridomas são conhecidos dos familiarizados com a área.

De preferência, o animal imunizado é um animal não humano que expressa genes de imunoglobulinas humanas e as células B do baço são fundidas com um mieloma derivado da mesma espécie do animal não humano. Mais de preferência, o animal imunizado é um animal XENOMOUSE™ e a linha celular de mieloma é um mieloma de murganho não secretório, como seja a linha celular de mieloma P3-X63-AG8-653 (ATCC). Ver, e.g., Exemplo 1.

Assim, a descrição proporciona métodos para a produção de uma linha celular que produz um anticorpo monoclonal humano ou um seu fragmento dirigido contra MAdCAM compreendendo (a) imunização de um animal transgénico não humano aqui descrito com MAdCAM, uma porção de MAdCAM ou uma célula ou tecido que expresse MAdCAM; (b) permitindo que o animal transgénico monte uma resposta imune contra MAdCAM; (c) isolamento das células produtoras de anticorpos a partir do animal transgénico; (d) imortalização das células produtoras de anticorpos; (e) criação de populações monoclonais individuais das células produtoras de anticorpos imortalizadas; e (f) rastreio das

células produtoras de anticorpos imortalizadas ou sobre-nadantes de cultura das mesmas para identificar um anticorpo dirigido contra MAdCAM.

Num aspecto, o invento proporciona hibridomas que produzem anticorpos anti-MAdCAM. Numa forma de realização preferida, os hibridomas são hibridomas de murganho, como descrito atrás. Numa outra forma de realização, os hibridomas são produzidos numa espécie não humana não murganho como sejam ratos, ovelhas, porcos, cabras, gado bovino e cavalos. Numa outra forma de realização, os hibridomas são hibridomas humanos, nos quais uma célula de mieloma humana não secretória é fundida com uma célula humana que expressa um anticorpo anti-MAdCAM.

Ácidos nucleicos, vectores, células hospedeiras e métodos recombinantes da preparação de anticorpos

*Ácidos nucleicos*

São proporcionadas moléculas de ácido nucleico codificadores de anticorpos anti-MAdCAM do invento. Numa forma de realização, a molécula de ácido nucleico codifica uma cadeia pesada e/ou leve de uma imunoglobulina anti-MAdCAM. Numa forma de realização preferida, uma molécula de ácido nucleico simples codifica uma cadeia pesada de uma imunoglobulina anti-MAdCAM e uma outra molécula de ácido nucleico codifica a cadeia leve de uma imunoglobulina anti-MAdCAM. Numa forma de realização preferida, a imunoglobu-

lina codificada é uma imunoglobulina humana, de preferência uma IgG humana. A cadeia leve codificada pode ser uma cadeia X ou uma cadeia  $\kappa$ , de preferência uma cadeia  $\kappa$ .

Numa forma de realização preferida, a molécula de ácido nucleico codificadora da região variável da cadeia leve compreende a sequência germinal de um gene V $\kappa$  humano A2, A3, A26, B3, 012 ou 018 ou uma variante da referida sequência. Numa forma de realização preferida, a molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia leve compreende uma sequência derivada de um gene J $\kappa$ 1, J $\kappa$ 2, J $\kappa$ 3, J $\kappa$ 4 ou J $\kappa$ 5. Numa forma de realização preferida, a molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia leve codifica não mais de onze alterações de aminoácidos do gene germinal V $\kappa$  A2, A3, A26, B3, 012 ou 018, de preferência não mais de seis alterações de aminoácidos e mesmo ainda mais preferencialmente não mais de três alterações de aminoácidos. Numa forma de realização mais preferida, o ácido nucleico codificador da cadeia leve é a sequência germinal.

Descreve-se uma molécula de ácido nucleico que codifica uma região variável da cadeia leve (VL) contendo até onze alterações de aminoácidos comparativamente com a sequência germinal, em que as alterações de aminoácidos são idênticas às alterações de aminoácidos da sequência germinal da VL de um dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Também é descrita uma molécula de ácido

nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Também é descrita uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos de uma ou mais CDRs de qualquer uma das cadeias leves de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácidos de todas as CDRs de qualquer uma das cadeias leves de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a molécula de ácido nucleico coompreende uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos de uma das SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68 ou compreende uma sequência nucleotídica de uma das SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ou 67. Numa outra descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos de uma ou mais CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68 ou compreende uma sequência nucleotídica de uma ou mais CDRs de qualquer uma das SEQ ID

NOS:3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ou 67. Numa descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos de todas as CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68 ou compreende a sequência nucleotídica de todas as CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS:3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ou 67.

Descreve-se igualmente uma molécula de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos de uma VL que tem a sequência de aminoácidos que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma VL descrita atrás, particularmente a uma VL que compreende uma sequência de aminoácidos de uma das SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66 or 68. Também é descrita uma sequência nucleotídica que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma sequência nucleotídica de uma das SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ou 67.

É descrita uma molécula de ácido nucleico que hibrida em condições altamente restritivas com uma molécula de ácido nucleico codificadora de uma VL como descrito atrás, particularmente uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência nucleotídica codificadora de uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NOS: 4, 8,



12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66 ou 68. É igualmente proporcionada uma molécula de ácido nucleico que hibrida em condições altamente restritivas com uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica de uma das SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ou 67.

Também é descrita uma molécula de ácido nucleico codificadora de uma região variável da cadeia pesada (VH) que utiliza um gene VH humano 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 ou 4-4. Nalgumas descrições, a molécula de ácido nucleico codificadora do gene VH ainda utiliza um gene humano da família JH4 ou JH6. Nalgumas descrições, a molécula de ácido nucleico codificadora do gene VH utiliza o gene humano JH4b ou JH6b. Numa outra descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência derivada de um gene humano D 3-10, 4-23, 5-5, 6-6 ou 6-19. Numa outra descrição a molécula de ácido nucleico codificadora de VH possui não mais de quinze alterações de aminoácidos dos genes germinais VH1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 ou 4-4, de preferência não mais de seis alterações de aminoácidos e mesmo mais de preferência não mais de três alterações de aminoácidos. Numa outra descrição, a molécula de ácido nucleico codificadora de VH possui pelo menos uma alteração de aminoácidos comparativamente com a sequência germinal, em que a alteração de aminoácidos é idêntica a uma alteração de aminoácidos da sequência germinal da cadeia pesada de um dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5,

7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a VH possui não mais de quinze alterações de aminoácidos comparativamente com as sequências germinais, em que as alterações são idênticas às alterações da sequência germinal da VH de um dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod.

Numa descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos da VH de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos de uma ou mais das CDRs da cadeia pesada de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa descrição, a molécula de ácido nucleico compreende as sequências nucleotídicas que codificam as sequências de aminoácidos de todas as CDRs da cadeia pesada de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos de uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30,

34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ou 64 ou que compreende uma sequência nucleotídica de uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ou 63. Numa outra descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos de uma ou mais das CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ou 64 ou compreende uma sequência nucleotídica de uma ou mais das CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ou 63. Numa descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica que codifica as sequências de aminoácidos de todas as CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ou 64 ou compreende uma sequência nucleotídica de todas as CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ou 63. Numa descrição, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica codificadora de uma região contígua desde o começo da CDR1 até ao fim da CDR3 de uma cadeia pesada ou leve de qualquer um dos anticorpos anti-MAdCAM atrás referidos.

Numa outra descrição, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácidos de uma VH que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma das sequências de aminoácidos codificadora de uma VH como descrito imediatamente atrás, particularmente a uma VH que compreende uma sequência de

aminoácidos de uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ou 64. É igualmente descrita uma sequência nucleotídica que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma sequência nucleotídica de uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ou 63.

Numa outra descrição, a molécula de ácido nucleico codificadora de uma VH é uma que hibrida em condições altamente restritivas com uma sequência nucleotídica codificadora de uma VH como atrás descrito, particularmente com uma VH que compreende uma sequência de aminoácidos de uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ou 64. É igualmente proporcionada uma sequência nucleotídica codificadora de uma VH que hibrida em condições altamente restritivas com uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica de uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ou 63.

A sequência nucleotídica codificadora de uma ou de ambas as cadeias pesada e leve de um anticorpo anti-MAdCAM ou das suas regiões variáveis pode ser obtida a partir de qualquer fonte que produza um anticorpo anti-MAdCAM. Métodos de isolamento de mRNA codificador de um anticorpo são bem conhecidos na área. Ver, *e.g.*, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). O mRNA pode ser usado para produzir DNA para

usar na reacção em cadeia da polimerase (PCR) ou na clonagem de cDNA de genes de anticorpos. Numa forma de realização do invento, as moléculas de ácido nucleico podem ser obtidas a partir de um hibridoma que expressa um anticorpo anti-MAdCAM, como descrito atrás, de preferência um hibridoma que tem como parceiro de fusão uma célula de animal transgénico que expressa genes de imunoglobulina humana, tais como um animal XENOMOUSE™, um animal transgénico não humano murganho ou um animal transgénico não humano, não murganho. Numa outra forma de realização, o hibridoma deriva de um animal não humano não transgénico, o qual pode ser usado, e.g., para anticorpos humanizados.

Uma molécula de ácido nucleico codificadora da totalidade da cadeia pesada de um anticorpo anti-MAdCAM pode ser construída através da fusão de uma molécula de ácido nucleico codificadora da totalidade do domínio variável de uma cadeia pesada, ou de um domínio de ligação ao antigénio do mesmo, com um domínio constante de uma cadeia pesada. De forma semelhante, uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia leve de um anticorpo anti-MAdCAM pode ser construída através da fusão de uma molécula de ácido nucleico codificadora do domínio variável de uma cadeia leve, ou de um seu domínio de ligação ao antigénio, com um domínio constante de uma cadeia leve. As moléculas de ácido nucleico codificadoras das regiões VH e VL podem ser convertidas em genes de anticorpos de tamanho completo através da sua inserção em vectores de expressão já codificadores das regiões constantes da cadeia pesada e da

cadeia leve, respectivamente, de forma que o segmento VH seja operacionalmente ligado a segmentos da região constante da cadeia pesada (CH) dentro do vector e o segmento VL seja operacionalmente ligado ao segmento da região constante da cadeia leve (CL) dentro do vector. Como alternativa, as moléculas de ácido nucleico codificadoras das cadeias VH ou VL são convertidas em genes de anticorpos de tamanho completo através da associação, *e.g.*, ligação, da molécula de ácido nucleico codificadora de uma cadeia VH com uma molécula de ácido nucleico codificadora de uma cadeia CH usando técnicas convencionais de biologia molecular. O mesmo pode ser conseguido usando moléculas de ácido nucleico codificadoras das cadeias VL e CL. As sequências dos genes da região constante das cadeias pesada e leve humanas são conhecidas na área. Ver, *e.g.*, Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242 (1991). As moléculas de ácido nucleico codificadoras das cadeias pesada e/ou leve de tamanho completo podem ser então expressas a partir de uma célula na qual foram introduzidas e isolado o anticorpo anti-MAdCAM.

Numa descrição, o ácido nucleico codificador da região variável da cadeia pesada codifica a região variável das sequências de aminoácidos das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 4, 8, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ou 64 e a molécula de ácido nucleico codificadora da região variável das cadeias leves codifica a região variável da sequência de aminoácidos das SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66 ou 68.

Numa forma de realização, uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia pesada de um anticorpo anti-MAdCAM ou de uma porção de ligação ao antigénio do mesmo ou a cadeia leve de um anticorpo anti-MAdCAM ou de uma porção de ligação ao antigénio do mesmo pode ser isolada a partir de um animal não humano não murganhão que expressa genes de imunoglobulina humana e foi imunizado com antigénio MAdCAM. Numa outra forma de realização, a molécula de ácido nucleico pode ser isolada a partir de uma célula produtora de anticorpo anti-MAdCAM derivada de um animal não transgénico ou de um doente humano que produz anticorpos anti-MAdCAM. O mRNA das células produtoras do anticorpo anti-MAdCAM pode ser isolado por técnicas convencionais, clonado e/ou amplificado usando PCR e técnicas de construção de bibliotecas e testadas usando protocolos convencionais para obter moléculas de ácido nucleico codificadoras das cadeias pesada e leve anti-MAdCAM.

As moléculas de ácido nucleico podem ser usadas para expressar por via recombinante grandes quantidades de anticorpos anti-MAdCAM como descrito abaixo. As moléculas de ácido nucleico podem também ser usadas para produzir anticorpos quiméricos, anticorpos de cadeia simples, imunoadesinas, diacorpos, anticorpos mutados e derivados de anticorpos, como descrito mais abaixo. Se as moléculas de ácido nucleico derivarem de um animal não humano não transgénico, as moléculas de ácido nucleico podem ser

usadas para a humanização de anticorpos, igualmente como descrito abaixo.

Numa outra forma de realização, as moléculas de ácido nucleico do invento podem ser usadas como sondas ou sequências iniciadoras de PCR para sequências de anticorpos específicos. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico sonda pode ser usada em métodos de diagnóstico ou uma molécula de ácido nucleico sequência iniciadora de PCR pode ser usada para amplificar regiões de DNA que poderão ser usadas, *inter alia*, para isolar sequências nucleotídicas para usar na produção de domínios variáveis de anticorpos anti-MAdCAM. Numa forma de realização preferida, as moléculas de ácido nucleico são oligonucleótidos. Numa forma de realização mais preferida, os oligonucleótidos são de regiões altamente variáveis das cadeias pesada e leve do anticorpo de interesse. Numa forma de realização ainda mais preferida, os oligonucleótidos codificam a totalidade ou parte de uma ou mais das CDRs.

#### *Vectores*

O invento proporciona vectores compreendendo as moléculas de ácido nucleico do invento que codificam a cadeia pesada ou a sua porção de ligação ao antigénio. O invento também proporciona vectores compreendendo as moléculas de ácido nucleico do invento que codificam a cadeia leve ou a sua porção de ligação ao antigénio. O invento também proporciona vectores compreendnedo moléculas



de ácido nucleico codificadoras de proteínas de fusão, anticorpos modificados, fragmentos de anticorpos e sondas dos mesmos.

Para expressar os anticorpos, ou porções dos anticorpos do invento, DNAs codificadores de parte ou da totalidade das cadeias leve e pesada, obtidos como descrito atrás, são inseridos em vectores de expressão de forma que os genes sejam operacionalmente ligados a sequências de controlo da transcrição e da tradução. Os vectores de expressão incluem plasmídeos, retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados (AAV), vírus de plantas tais como vírus do mosaico da couve-flor, vírus do mosaico do tabaco, cosmídeos, YACs, epissomas derivados de EBV e similares. O gene do anticorpo é ligado a um vector de forma que sequências de controlo da transcrição e da tradução dentro do vector sirvam a função a que se destinam de regulação da transcrição e da tradução do gene do anticorpo. O vector de expressão e as sequências de controlo da expressão são escolhidos de forma a serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene da cadeia leve do anticorpo e o gene da cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vectores separados. Numa forma de realização preferida, ambos os genes são inseridos no mesmo vector de expressão. Os genes do anticorpo são inseridos no vector de expressão segundo métodos convencionais (e.g., ligação de locais de restrição complementares no fragmento do gene do anticorpo e do vector ou ligação de extremos cerses se não existirem locais de restrição).

Um vector conveniente é um que codifica uma sequência de imunoglobulina CH ou CL humana completamente funcional, com locais de restrição adequados introduzidos de forma que qualquer sequência VH ou VL possa ser facilmente inserida e expressa, como descrito atrás. Nesses vectores, geralmente ocorre "splicing" entre o local dador de "splicing" na região J inserida e o local aceitador de "splicing" que precede a região C humana e também nas regiões de "splicing" que surgem dentro dos exões CH humanos. A poliadenilação e a terminação da transcrição ocorrem em locais cromossómicos nativos a jusante das regiões codificadoras. O vector de expressão recombinante pode também codificar um péptido sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo pela célula hospedeira. O gene da cadeia de anticorpo pode ser clonado no vector de forma que o péptido sinal seja ligado em grelha ao extremo amina do gene da cadeia de anticorpo. O péptido sinal pode ser um péptido sinal de imunoglobulina ou um péptido sinal heterólogo (*i.e.* um péptido sinal derivado de uma proteína não imunoglobulina).

Para além dos genes das cadeias de anticorpo, os vectores de expressão recombinantes do invento possuem sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes das cadeias de anticorpo numa célula hospedeira. Será apreciado pelos familiarizados com a área que o desenho de um vector de expressão, incluindo a selecção de sequências reguladoras pode depender de factores tais como a escolha

da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína pretendida, etc. Sequências reguladoras preferidas para a expressão em células hospedeiras de mamífero incluem elementos virais que dirigem níveis elevados de expressão proteica em células de mamífero, tais como promotores e/ou estimuladores derivados de LTRs retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tais como o promotor/estimulador de CMV), Vírus Símio 40 (SV40) (como seja o promotor/estimulador de SV40), adenovírus (e.g., o principal promotor tardio de adenovírus (AdMLP)), políoma e promotores fortes de mamífero como sejam os promotores nativos de imunoglobulinas e de actina. Para mais descrição de elementos reguladores virais e suas sequências, ver, e.g., Patentes U.S. Nos 5168062, 4510245 e 4968615. Métodos para a expressão de anticorpos em plantas, incluindo uma descrição dos promotores e vectores, assim como para a transformação de plantas são conhecidos na área. Ver, e.g., Patente dos Estados Unidos 6517529. Métodos de expressão de polipéptidos em células bacterianas ou em células de fungos, e.g., células de levedura, são igualmente conhecidos na área.

Para além dos genes das cadeias de anticorpos e sequências reguladoras, os vectores de expressão recombinante do invento podem ser portadores de outras sequências que regulam a replicação do vector nas células hospedeiras (e.g., origens de replicação) e genes de marcas seleccionáveis. O gene da marca seleccionável facilita a selecção de células hospedeiras nas quais o vector tenha sido

introduzido (ver, e.g., Pat. U.S. 4399216, 4634665 e 5179017). Por exemplo, tipicamente o gene da marca seleccionável confere resistência a fármacos, como seja G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira na qual o vector foi introduzido. Genes de marcas seleccionáveis preferidos incluem o gene da diidrofolato redutase (DHFR) (para usar em células hospedeiras dhfr- com selecção/amplificação com metotrexato) e o gene neo (para selecção com G418) e o gene da sintetase de glutamato.

*Células hospedeiras não hibridoma e métodos recombinantes de produção de proteínas*

As moléculas de ácido nucleico codificadoras da cadeia pesada ou de uma porção de ligação ao antigénio e/ou da cadeia leve ou uma porção de ligação ao antigénio de um anticorpo anti-MAdCAM e vectores compreendendo estas moléculas de ácido nucleico, podem ser usadas para transformação de uma célula hospedeira adequada de mamífero, planta, bactéria ou levedura. A transformação pode ser por qualquer método conhecido para a introdução de polinucleótidos numa célula hospedeira. Métodos para a introdução de polinucleótidos heterólogos em células de mamífero são conhecidos na área e incluem transfecção mediada por dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, electroporação, encapsulação dos polinucleótidos em lipossomas, injeção biolística e microinjecção directa do DNA no núcleo. Ainda, as moléculas de ácido nucleico podem ser

introduzidas em células de mamífero através de vectores virais. Métodos de transformação de células são conhecidos na área. Ver, *e.g.*, Patentes U.S. Nos. 4399216, 4912044, 4740461, e 4959455. Métodos de transformação de células vegetais são conhecidos na área, incluindo, *e.g.* transformação mediada por *Agrobacterium*, transformação biolística, injeção directa, electroporação e transformação viral. Métodos de transformação de células bacterianas e de levedura são igualmente conhecidas na área.

Linhas celulares de mamífero disponíveis como hospedeiras para a expressão são conhecidas na área e incluem muitas linhas celulares imortalizadas disponíveis na American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluem, *inter alia*, células de ovário de hamster chinês (CHO), NS0, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de rim de hamster bebé (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (*e.g.*, Hep G2), células A549, células 3T3 e uma série de outras linhas celulares. Células hospedeiras de mamífero incluem células humanas, de murganho, de rato, de cão, de macaco, de porco, de cabra, de bovino, de cavalo e de cobaio. Linhas celulares particularmente preferidas são seleccionadas determinando quais as linhas celulares que possuem níveis de expressão mais elevados. Outras linhas celulares que podem ser usadas são as linhas celulares de insecto, tais como células Sf9, células de anfíbios, células bacterianas, células vegetais e células de fungos. Quando os vectores de expressão recombinantes codificadores

da cadeia pesada ou da porção de ligação ao antígeno da mesma, da cadeia leve e/ou da sua porção de ligação ao antígeno são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, são produzidos anticorpos através da cultura das células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais de preferência, secreção do anticorpo para o meio de cultura em que as células hospedeiras são mantidas. Os anticorpos podem ser recuperados a partir do meio de cultura usando métodos convencionais de purificação de proteínas. Células hospedeiras vegetais incluem, e.g., *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lentilha aquática, milho, trigo, batata, etc. Células hospedeiras bacterianas incluem *E. coli* e espécies de *Streptomyces*. Células hospedeiras de levedura incluem *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

Ainda, a expressão de anticorpos do invento (ou partes dos mesmos) a partir de linhas celulares produtoras pode ser aumentada usando uma série de técnicas conhecidas. Por exemplo, o sistema de expressão do gene da sintetase de glutamina (o sistema GS) é uma abordagem comum para aumentar a expressão em determinadas condições. O sistema GS está discutido na sua totalidade ou em parte nas Patentes Europeias Nos. 0216 846, 0 256 055, 0 338 841 e 0 323 997.

É provável que os anticorpos expressos por diferentes linhas celulares ou em animais transgênicos

terão glicosilação diferente. No entanto, todos os anticorpos codificados pelas moléculas de ácido nucleico aqui proporcionadas ou compreendendo as sequências de aminoácidos aqui proporcionadas são parte do presente invento, independentemente da glicosilação dos anticorpos.

*Animais e plantas transgênicos*

O invento também proporciona animais transgênicos não humanos e plantas transgênicas compreendendo uma ou mais moléculas de ácido nucleico do invento que podem ser usados para produzir os anticorpos do invento. Os anticorpos podem ser produzidos e recuperados a partir de tecidos ou fluidos corporais, tais como leite, sangue ou urina, de cabras, vacas, cavalos, porcos, ratos, murganhos, coelhos, cobaios ou outros mamíferos. Ver, e.g., Patentes U.S. Nos. 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172, e 5,741,957. Como descrito atrás, os animais transgênicos não humanos que compreendem *loci* de imunoglobulinas humanas podem ser imunizados com MAdCAM ou uma porção do mesmo. Métodos para a produção de anticorpo em plantas estão descritos, e.g., nas Patentes U.S. 6,046,037 e 5,959,177.

Numa outra forma de realização, animais transgênicos não humanos e plantas transgênicas são produzidas através da introdução de uma ou mais moléculas de ácido nucleico do invento no animal ou planta segundo técnicas transgênicas convencionais. Ver Hogan, *supra*. As células

transgênicas usadas na preparação do animal transgênico podem ser células estaminais embrionárias, células somáticas ou células de ovos fertilizados. Os organismos transgênicos não humanos podem ser quiméricos, heterozigóticos não quiméricos e homozigóticos não quiméricos. Ver, *e.g.*, Hogan *et al.*, "Manipulating the mouse Embryo: A Laboratory Manual" 2ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson *et al.*, "Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach", Oxford University Press (2000); e Pinkert "Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook", Academic Press (1999). Numa outra forma de realização, os organismos transgênicos não humanos podem ter uma disrupção orientada e substituição que codifica uma cadeia pesada e/ou leve de interesse. Numa forma de realização preferida, o animal ou plantas transgênicos compreendem e expressam moléculas de ácido nucleico codificadoras das cadeias pesada e leve que se combinam para se ligarem especificamente a MAdCAM, de preferência a MAdCAM humano. Numa outra forma de realização, os animais ou plantas transgênicos compreendem moléculas de ácido nucleico codificadoras de um anticorpo modificado como seja um anticorpo de cadeia simples, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Os anticorpos anti-MAdCAM podem ser feitos em qualquer animal transgênico. Numa forma de realização preferida, os animais não humanos são murganhos, ratos, ovelhas, porcos, cabras, bovinos ou cavalos. O animal transgênico não humano expressa os referidos polipéptidos no sangue, leite, urina, saliva, lágrimas, muco e outros fluidos corporais.



*Bibliotecas de apresentação fágica*

A descrição proporciona um método para a produção de um anticorpo anti-MAdCAM u porção de ligação ao antigénio do mesmo compreendendo os passos de síntese de uma biblioteca de anticorpos humanos em fagos, rastreio da biblioteca com um MAdCAM ou porção do mesmo, isolamento dos fagos que se ligam a MAdCAM e obtenção do anticorpo a partir do fago. Um método para preparar a biblioteca de anticorpos compreende os passos de imunização de um animal hospedeiro não humanos compreendendo um *locus* de imunoglobulina humana com MAdCAM ou uma porção antigénica do mesmo para criar uma resposta imune, extracção das células do animal hospedeiro que são responsáveis pela produção de anticorpos; isolamento do RNA das células extraídas, transcrição reversa do RNA para produzir cDNA, amplificação do cDNA usando uma sequência iniciadora e inserção do cDNA no vector de apresentação fágica de forma que os anticorpos sejam expressos no fago. Os anticorpos recombinantes anti-MAdCAM do invento podem ser obtidos desta forma.

Anticorpos humanos recombinantes anti-MAdCAM do invento para além dos anticorpos anti-MAdCAM aqui descritos podem ser isolados através do rastreio de uma biblioteca combinatória de anticorpos recombinantes, de preferência uma biblioteca de apresenação fágica de scFv, preparada usando cDNAs de VL e VH humanos preparados a partir de mRNA isolado a partir de linfócitos humanos. As metodologias para a preparação e rastreio de tais bibliotecas são

conhecidas na área. Existem kits comerciais para a geração de bibliotecas de apresentação fágica (e.g., o Recombinant Phage Antibody System da Pharmacia, nº de catálogo 27-9400-01; e o kit de apresentação fágica SurfZAP<sup>™</sup> da Stratagene, nº de catálogo 240612). Existem também outros métodos e reagentes que podem ser usados na geração e rastreio de bibliotecas de apresentação de anticorpos (ver, e.g., U.S. Pat. No. 5,223,409; Publicação PCT No. WO 92/18619; Publicação PCT No. WO 91/17271; Publicação PCT No. WO 92/20791; Publicação PCT No. WO92/15679; Publicação PCT No. WO 93/01288; Publicação PCT No. WO 92/01047; Publicação PCT No. WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991), *Biotechnology*, 9:1369-1372; Hay *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3:81-85 (1992); Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989); McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990); Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12:725-734 (1993); Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992); Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991); Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580 (1992); Garrad *et al.*, *Biotechnology*, 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom *et al.*, *Nuc Acid Res*, 19:4133-4137 (1991); e Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991).

Para isolar anticorpos humanos anti-MAdCAM com as características pretendidas, um anticorpo humano anti-MAdCAM como aqui descrito é primeiro usado para seleccionar sequências das cadeia pesada e leve humanas tendo actividade de ligação semelhante para MAdCAM, usando os métodos de impressão de epitopos descritos em Hoogenboom *et*

*al.*, Publicação PCT No. WO 93/06213. As bibliotecas de anticorpos usadas neste método são preferencialmente bibliotecas de scFv preparadas e testado como descrito em McCafferty *et al.*, Publicação PCT No. WO 92/01047, McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990); e Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12:725-734 (1993). As bibliotecas de anticorpos scFv preferencialmente são testadas usando como antigénio MAdCAM humano.

Uma vez seleccionados os segmentos VL e VH humanos, são realizadas experiências de "mistura e combinação", em que diferentes pares dos segmentos VL e VH inicialmente seleccionados são testados relativamente à ligação de MAdCAM, para seleccionar combinações de pares VL/VH preferidas. Ainda, para melhorar mais a qualidade do anticorpo, os segmentos VL e VH dos pares VL/VH preferidos podem ser mutados ao acaso, de preferência dentro da região CDR3 de VH e/ou VL, num processo análogo ao processo de mutação somática *in vivo* responsável pela maturação de afinidade dos anticorpos durante uma resposta imune natural. Esta maturação de afinidade *in vitro* pode ser conseguida através da amplificação das regiões VH e VL usando sequências iniciadoras de PCR complementares da CDR3 de VH e da CDR3 de VL, respectivamente, sequências iniciadoras essas que foram "aspergidas" com uma mistura ao acaso das quatro bases nucleotídicas em determinadas posições de forma que os produtos de PCR resultantes codificam segmentos VH e VL nos quais mutações ao acaso foram introduzidas nas regiões CDR3 de VH e/ou VL. Estes segmentos VH e VL

mutados ao acaso podem ser novamente testados relativamente à ligação a MAdCAM.

Após rastreio e isolamento de um anticorpo anti-MAdCAM do invento a partir de uma biblioteca de apresentação de imunoglobulinas recombinantes, o ácido nucleico codificador do anticorpo seleccionado pode ser recuperado a partir do pacote de apresentação (e.g., a partir do genoma fágico) e subclonado noutros vectores de expressão através de técnicas de DNA recombinante convencionais. Caso se pretenda, o ácido nucleico pode ainda ser manipulado para criar outras formas de anticorpos do invento, como descrito abaixo. Para expressar um anticorpo humano recombinante isolado através do rastreio de uma biblioteca combinatória, o DNA codificador do anticorpo é clonado num vector de expressão recombinante e introduzido em células hospedeiras de mamífero, como descrito atrás.

#### *Mudança de classe*

Uma outra descrição proporciona um mecanismo através do qual a classe de um anticorpo anti-MAdCAM pode ser mudada para outra. Uma molécula de ácido nucleico codificadora de VL ou VH é isolada usando métodos conhecidos na área de forma que não inclua quaisquer sequências nucleotídicas codificadoras de CL ou CH. A molécula de ácido nucleico codificadora de VL ou de VH é então operacionalmente ligada a uma sequência nucleotídica codificadora de uma CL ou CH de uma classe diferente de

molécula de imunoglobulina, como descrito atrás. Por exemplo, um anticorpo anti-MAdCAM que era originalmente IgM pode mudar de classe para uma IgG. Ainda, a mudança de classe pode ser usada para converter uma subclasse de IgG numa outra, e.g., de IgG<sub>4</sub> para IgG<sub>2</sub>. Um método preferido para a produção de um anticorpo do invento compreendendo um isotipo pretendido ou subclasse de anticorpo compreende os passos de isolamento de um ácido nucleico codificador da cadeia pesada de um anticorpo anti-MAdCAM e um ácido nucleico codificador da cadeia leve de um anticorpo anti-MAdCAM, obtenção da região variável da cadeia pesada, ligação da região variável da cadeia pesada com o domínio constante de uma cadeia pesada do isotipo pretendido, expressão da cadeia leve e da cadeia ligada numa célula e colheita do anticorpo anti-MAdCAM com o isotipo pretendido.

#### Derivados de anticorpos

Pode-se usar as moléculas de ácido nucleico descritas atrás para gerar derivados de anticorpos usando técnicas e métodos conhecidos dos familiarizados com a área.

#### *Anticorpos humanizados*

A imunogenicidade de anticorpos não humanos pode ser reduzida até certo ponto usando técnicas de humanização, potencialmente usando técnicas de apresentação e bibliotecas adequadas. Será compreendido que anticorpos

murinos ou anticorpos de outras espécies podem ser humanizados ou primatizados usando técnicas conhecidas na área. Ver, e.g., Winter and Harris, *Immunol Today*, 14:43-46 (1993) and Wright *et al.*, *Crit. Reviews in Immunol.*, 12:125-168 (1992). O anticorpo de interesse pode ser manipulado por técnicas de DNA recombinante para substituir domínios de charneira C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>, e/ou o domínio estrutural com a correspondente sequência humana (ver WO 92/02190 e Patentes U.S. Nos. 5530101, 5595089, 5693761, 5693792, 5714350, e 5777085). Noutras formas de realização, um anticorpo anti-MAdCAM não humano pode ser humanizado por substituição do domínio de charneira C<sub>H1</sub>. Os domínios C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> e/ou estruturais com a correspondente sequência humana de um anticorpo anti-MAdCAM do invento.

#### *Anticorpos mutados*

Numa outra forma de realização, as moléculas de ácido nucleico, vectores e células hospedeiras podem ser usadas para preparar anticorpos anti-MAdCAM mutados. Os anticorpos podem ser mutados nos domínios variáveis das cadeias pesada e/ou leve para alterar uma propriedade de ligação do anticorpo. Por exemplo, pode ser feita uma mutação numa ou mais regiões de CDR para aumentar ou diminuir o K<sub>d</sub> do anticorpo relativamente a MAdCAM. As técnicas de mutagénese dirigida são conhecidas na área. Ver, e.g., Sambrook *et al.*, e Ausubel *et al.*, *supra*. Numa descrição, as mutações são preparadas num resíduo de aminoácido que se sabe estar alterado comparativamente com

a linha germinal numa região variável de um anticorpo anti-MAdCAM. Numa outra forma de realização da descrição, são feitas uma ou mais mutações num resíduo de aminoácido que se sabe estar alterado comparativamente com a linha germinal numa região variável ou região CDR de um dos anticorpos anti-MAdCAM 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 720.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição, são feitas uma ou mais mutações num resíduo de aminoácido que se sabe estar alterado comparativamente com a linha germinal numa região variável ou região CDR cuja sequência de aminoácidos está apresentada em SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ou 68 ou cuja sequência nucleotídica está apresentada em SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65 ou 67. Numa outra forma de realização, as moléculas de ácido nucleico são mutadas numa ou mais regiões estruturais. Uma mutação pode ser feita numa região estrutural ou domínio constante para aumentar a semi-vida do anticorpo anti-MAdCAM. Ver, *e.g.*, 00/09560, publicado em 24 de Fevereiro, 2000. Numa forma de realização, pode haver uma, três ou cinco ou dez mutações pontuais e não mais de quinze mutações pontuais. Uma mutação numa região estrutural ou domínio constante pode também ser feita para alterar a imunogenicidade do anticorpo, para proporcionar um local para a ligação covalente ou não covalente a uma outra molécula ou para

alterar propriedades tais como fixação do complemento. Podem ser feitas mutações em cada uma das regiões estruturais, no domínio constante e nas regiões variáveis num único anticorpo mutado. Como alternativa, as mutações podem ser feitas em apenas um das regiões estruturais, das regiões variáveis ou do domínio constante num único anticorpo mutado.

Numa forma de realização, não há mais de quinze alterações de aminoácidos nas regiões VH ou VL do anticorpo anti-MAdCAM mutado comparativamente com o anticorpo anti-MAdCAM antes da mutação. Numa forma de realização mais preferida, não existem mais de dez alterações de aminoácidos nas regiões VH ou VL do anticorpo anti-MAdCAM mutado, mais de preferência não mais de cinco alterações de aminoácidos ou mesmo mais de preferência não mais de três alterações de aminoácidos. Numa outra forma de realização, não existem mais de quinze alterações de aminoácidos nos domínios constantes, mais de preferência, não mais de dez alterações de aminoácidos, mesmo mais de preferência, não mais de cinco alterações de aminoácidos.

#### *Anticorpos modificados*

Numa outra forma de realização, pode ser feito um anticorpo de fusão ou imunoadesina que compreende a totalidade ou uma porção de um anticorpo anti-MAdCAM ligado a um outro polipéptido. Numa forma de realização preferida, apenas as regiões variáveis do anticorpo anti-MAdCAM estão



ligadas ao polipéptido. Numa outra forma de realização preferida, o domínio VH de um anticorpo anti-MAdCAM é ligado a um primeiro polipéptido, enquanto o domínio VL de um anticorpo anti-MAdCAM é ligado a um segundo polipéptido que se associa com o primeiro polipéptido de forma que os domínios VH e VL podem interagir um com o outro para formar um local de ligação do anticorpo. Numa outra forma de realização preferida, o domínio VH é separado do domínio VL por um elemento de ligação de forma que os domínios VH e VL possam interagir um com o outro (ver abaixo em Anticorpos de Cadeia Simples). O anticorpo VH-elemento de ligação-VL é então ligado ao polipéptido de interesse. O anticorpo de fusão é útil para dirigir um polipéptido para uma célula ou tecido que expressa MAdCAM. O polipéptido pode ser um agente terapêutico, como seja uma toxina, factor de crescimento ou outra proteína reguladora ou pode ser um agente de diagnóstico, como seja uma enzima que pode ser facilmente visualizado, como seja peroxidase de rábano silvestre. Ainda, podem ser criados anticorpos de fusão em que dois ou mais anticorpos de cadeia simples são ligados um ao outro. Isto é útil caso se pretenda criar um anticorpo divalente ou polivalente numa cadeia polipeptídica simples ou caso se pretenda criar um anticorpo biespecífico.

Para criar um anticorpo de cadeia simples, (scFv) os fragmentos de DNA codificadores de VH e VL são operacionalmente ligados a um outro fragmento codificador de um elemento de ligação flexível, e.g., codificador da

sequência de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de forma que as sequências VH e VL possam ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões VL e VH ligadas por um elemento de ligação flexível (ver, *e.g.*, Bird *et al.*, Science, 242:423-426 (1988); Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988); McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990)). O anticorpo de cadeia simples pode ser monovalente, se apenas forem usadas uma única VH e VL, bivalente se forem usadas duas VH e VL ou polivalente se mais de duas VH e VL forem usadas.

Numa outra forma de realização, outros anticorpos modificados podem ser preparados usando moléculas de ácido nucleico codificadoras de anti-MAdCAM. Por exemplo, "corpos capa" (III *et al.*, Protein Eng, 10: 949-57(1997)), "Ivlinicorpos" (Martin *et al.*, EMBO J, 13: 5303-9(1994)), "Diacorpos" (Holliger *et al.*, PNAS USA, 90: 6444-6448(1993)), ou "Janusinas" (Traunecker *et al.*, EMBO J, 10:3655-3659 (1991) e Traunecker *et al.*, "Janusin: new molecular design for bispecific reagents," Int J Cancer Suppl, 7:51-52 (1992)) podem ser preparados usando técnicas de biologia molecular convencionais seguindo os ensinamentos da especificação.

Num outro aspecto, podem ser gerados anticorpos quiméricos e biespecíficos. Pode ser produzido um anticorpo quimérico que compreende CDRs e regiões estruturais dos diferentes anticorpos. Numa forma de realização preferida, as CDRs do anticorpo quimérico compreende todas as CDRs da

região variável de uma cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo humano anti-MAdCAM, enquanto as regiões estruturais derivam de um ou mais anticorpos diferentes. Numa forma de realização mais preferida, as CDRs do anticorpo quimérico compreendem a totalidade dos CDRs das regiões variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada de um anticorpo humano anti-MAdCAM. As regiões estruturais podem ser de uma outra espécie e podem, numa forma de realização preferida, ser humanizados. Como alternativa, as regiões estruturais pode ser de um outro anticorpo humano.

Pode ser gerado um anticorpo biespecífico que se liga especificamente a MAdCAM através de um domínio de ligação e a uma segunda molécula através de um segundo domínio de ligação. O anticorpo biespecífico pode ser produzido através de técnicas recombinantes de biológica molecular ou pode ser fisicamente conjugado. Ainda, pode ser gerado um anticorpo de cadeia simples contendo mais de uma VH e VL que se liga especificamente a MAdCAM e a uma outra molécula. Tais anticorpos biespecíficos podem ser gerados usando técnicas que são bem conhecidas por exemplo em associação com (i) e (ii) ver, *e.g.*, Fanger *et al.*, Immunol Methods 4: 72-81 (1994) e Wright and Harris, *supra* E em associação com (iii) ver, *e.g.*, Traunecker *et al.*, Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 51-52 (1992). Numa forma de realização preferida, o anticorpo biespecífico liga-se a MAdCAM e a uma outra molécula expressa em nível elevado nas células endoteliais. Numa forma de realização mais preferida, a outra molécula é VCAM, ICAM ou L-selectina.

Em várias descrições, os anticorpos modificados atrás descritos são preparados usando uma ou mais regiões CDR de um dos anticorpos selecionados de entre 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1 -mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Numa outra descrição os anticorpos modificados são preparados usando uma ou mais das regiões variáveis ou uma ou mais regiões CDRs cuja sequência de aminoácidos está apresentada em SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ou 68 ou cuja sequência de nucleótidos está apresentada em SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65 ou 67.

#### Anticorpos derivatizados e marcados

Um anticorpo ou porção de anticorpo do invento pode ser derivatizado ou ligado a uma outra molécula (e.g., um outro péptido ou proteína). Em geral, os anticorpos ou porções dos mesmos são derivatizados de forma que a ligação a MAdCAM não seja afectada adversamente pela derivatização ou marcação. Assim, os anticorpos e porções de anticorpos do invento destinam-se a incluir formas intactas e modificadas dos anticorpos humanos anti-MAdCAM aqui descritos, até ao ponto de serem incluídos em reivindicações independentes. Por exemplo, um anticorpo ou porção de anticorpo do

invento pode ser funcionalmente ligado (através de acoplagem química, fusão genética, associação não covalente ou outra) a uma ou mais de outras entidades moleculares, como seja um outro anticorpo (e.g., um anticorpo biespecífico ou um diacorpo), um agente de detecção, um agente citotóxico, um agente farmacêutico e/ou uma proteína ou péptido que possa mediar a associação do anticorpo ou porção de anticorpo a uma outra molécula (como seja a região central da estreptavidina ou uma marca de polihistidina).

Um tipo de anticorpo derivatizado é produzido através da ligação cruzada de dois ou mais anticorpos (do mesmo tipo ou de diferentes tipos, e.g., para criar anticorpos biespecíficos). Elementos de ligação adequados incluem os que são heterobifuncionais tendo dois grupos distintamente reactivos separados por um espaçador adequado (e.g., éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida) ou homobifuncional (e.g., suberato de di-succinimidilo). Tais elementos de ligação estão disponíveis na Pierce Chemical Company, Rockford, III.

Um outro tipo de anticorpo derivatizado é um anticorpo marcado, agentes de detecção úteis com os quais um anticorpo ou porção de anticorpo do invento possam ser derivatizados incluem compostos fluorescentes, incluindo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloreto de 5-dimetilamina-1-naftalenossulfonilo, ficoeritrina, lantanido fosforoso e similares. Um anticorpo pode

também ser marcado com enzimas que são úteis para a detecção, como seja peroxidase de rábano silvestre,  $\beta$ -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glucose oxidase e similares. Quando um anticorpo é marcado com uma enzima detectável, é detectado pela adição de outros reagentes que a enzima usa para produzir um produto de reacção que pode ser detectado. Por exemplo, quando está a peroxidase de rábano silvestre, a adição de peróxido de hidrogénio e diaminobenzidina leva a um produto de reacção corado, o qual é detectável. O anticorpo pode também ser marcado com biotina e detectado através da medição indirecta da ligação de avidina ou estreptavidina. Um anticorpo pode ser marcado com um agente magnético, como seja gadolínio. Um anticorpo pode também ser marcado com um epitopo polipeptídico pré-determinado reconhecido por um repórter secundário (e.g., sequências de fecho de pares de leucinas, locais de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação a metais, marcas de epitopos). Nalgumas formas de realização, as marcas são ligadas por braços espaçadores de vários tamanhos para reduzir o potencial bloqueio espacial.

Um anticopor anti-MAdCAM pode também ser marcado com um aminoácido marcado radioactivamente. A marca radioactiva pode ser usada para fins de diagnóstico e terapêuticos. Por exemplo, a marca radioactiva pode ser usada para detectar tecidos que expressam MAdCAM por raios X ou outras técnicas de diagnóstico. Ainda, a marca radioactiva pode ser usada terapeuticamente como uma toxina para tecido doente ou ou tumores que expressem MAdCAM.

Exemplos de marcas para polipéptidos incluem, mas não estão limitados aos seguintes isótopos radioactivos ou radionuclidos -  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ .

Um anticorpo anti-MAdCAM pode também ser derivatizado com um grupo químico como seja polietilenoglicol (PEG), um grupo metilo ou etilo ou um grupo de açúcar. Estes grupos podem ser úteis para melhorar as características biológicas do anticorpo, *e.g.*, para aumentar a semi-vida no soro ou para aumentar a ligação ao tecido. Esta metodologia também se aplicará a quaisquer fragmentos de ligação a antigénio ou versões de anticorpos anti-MAdCAM.

#### Composições farmacêuticas e kits

Num outro aspecto, o invento proporciona composições compreendendo um anticorpo inibidor anti-MAdCAM humano e métodos para o tratamento de indivíduos com tais composições. Nalgumas formas de realização, o alvo de tratamento é um ser humano. Noutras formas de realização, o indivíduo é um animal. Nalgumas formas de realização, o animal é um cão ou um primata não humano.

O tratamento pode envolver administração de um ou mais anticorpos monoclonais inibidores anti-MAdCAM do invento ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, sozinho ou juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável. Anticorpos inibidores anti-MAdCAM do invento e composições

compreendendo os mesmos podem ser administrados em combinação com outros agentes terapêuticos, de diagnóstico e/ou profiláticos. Outros agentes terapêuticos incluem agentes anti-inflamatórios ou imunomoduladores. Estes agentes incluem mas não estão limitados a corticosteróides tópicos ou orais tais como prednisolona, metilprednisolona, NCX-1015 ou budesonido; os amino-salicilatos tais como mesalazina, olsalazina, balsalazida ou NCX-456; a classe de imunomoduladores tais como azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, ciclosporina, FK506, IL-10 (Ilodecakin), IL-11 (Oprelevkin), IL-12, antagonistas de MIF/CD74, antagonistas de CD40, tais como TNX100/5-D12, antagonistas OX40L, pimecrolimus ou rapamicina; a classe de agentes anti-TNF $\alpha$  tais como infliximab, adalimumab, CDP-870, onercept, etanercept; a classe de agentes anti-inflamatórios, tais como inibidores PDE-4 (roflumilast, etc.), inibidores TACE (DPC-333, RDP-58, etc) e inibidores ICE (VX-740, etc) assim como antagonistas do receptor de IL-12, tais como daclizumab, a classe de antagonistas da molécula de adesão selectivos, tais como natalizumab, MLN-02 ou alicaforsen, classes de agentes analgésicos tais como inibidores COX-2 mas não lhes estando limitados, como seja rofecoxib, valdecoxib, celecoxib, moduladores dos canais sensibilizados por voltagem tipo P/Q ( $\alpha 2\delta$ ), como seja gabapentin e pregabalin, antagonistas do receptor NK-1, moduladores do receptor canabinóide e agonistas do receptor de delta opióides, assim como agentes anti-neoplásicos, anti-tumorais, anti-angiogénicos ou quimioterapêuticos. Tais agentes adicionais podem ser incluídos na mesma composição



ou administrados separadamente. Nalgumas formas de realização, um ou mais anticorpos inibidores anti-MAdCAM do invento podem ser usados como vacina ou como adjuvantes para uma vacina. Em particular, devido a MAdCAM ser expresso em tecido linfóide, os antigénios de vacinas podem ser vantajosamente direccionados para tecido linfóide através da conjugação do antigénio a um anticorpo anti-MAdCAM do invento.

Como aqui usado, "veículo farmacêuticamente aceitável" significa qualquer solvente, meio de dispersão, revestimento, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e estimuladores da absorção ou agentes de retardação e similares que sejam fisiologicamente compatíveis. Alguns exemplos de veículos farmacêuticamente aceitáveis são água, soro fisiológico, soro fisiológico tamponado com fosfatos, tampão acetato com cloreto de sódio, dextrose, glicerol, polietilenoglicol, etanol e similares, assim como combinações dos mesmos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo açúcares, polialcoóis tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. Outros exemplos de substâncias farmacêuticamente aceitáveis são tensioactivos, agentes molhantes ou quantidade diminutas de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, preservativos ou tampões, as quais aumentam a semi-vida ou eficácia do anticorpo.

As composições deste invento podem existir numa

variedade de formas, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semi-sólidas e sólidas, tais como soluções líquidas (e.g., soluções injectáveis ou para infusão), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, biolos liofilizados, pós secos, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo de administração e terapêutica pretendidos. Composições tipicamente preferidas são na forma de soluções injectáveis ou para infusão, como sejam composições semelhantes às usadas para a imunização passiva de seres humanos. O modo de administração preferido é o parentérico (e.g., intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular, intradérmico). Numa forma de realização preferida, o anticorpo é administrado por infusão ou injeção intravenosa. Numa outra forma de realização preferida, o anticorpo é administrado por injeção intramuscular, intradérmica ou subcutânea.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis nas condições de produção e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, bolo liofilizado, pó seco, microemulsão, dispersão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para concentração elevada de fármacos. Soluções estéreis injectáveis podem ser preparadas através da incorporação do anticorpo anti-MAdCAM na quantidade necessária num solvente adequado com um ou uma combinação de ingredientes atrás enumerados, conforme necessário, seguido de esterilização. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem sob vácuo e

lioofilização que dá um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicional pretendido a partir de uma sua solução previamente esterilizada. De um modo geral, as dispersões são preparadas através da incorporação do composto activo num veículo estéril que contem um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir dos enumerados atrás. As características pretendidas de uma solução podem ser mantidas, por exemplo, através da utilização de tensioactivos e o tamanho das partículas necessário, no caso da dispersão, através da utilização de tensioactivos, fosfolípidos e polímeros. A absorção prolongada de composições injectáveis pode ser conseguida através da inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo sais de monostearato, materiais poliméricos, óleos e gelatinas.

Os anticorpos do presente invento podem ser administrados por uma variedade de métodos conhecidos na área, ainda que para muitas aplicações terapêuticas a via/modo de administração preferido é subcutâneo, intramuscular, intradérmico ou infusão intravenosa. Como será apreciado pelos familiarizados com a matéria, a via e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados pretendidos.

Em determinadas formas de realização, as composições de anticorpos podem ser preparadas com um veículo que protegerá o anticorpo contra a libertação rápida, como seja formulação de libertação controlada, incluindo

implantes, pensos transdérmicos e sistemas de libertação microencapsulados. Podem ser usados polímeros biodegradáveis biocompatíveis, como seja acetato de etilenovinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações estão patenteados ou são conhecidos de um modo geral dos familiarizados com a matéria. Ver, e.g., "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems" (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978)).

Em determinadas formas de realização, o anticorpo anti-MAdCAM do invento pode ser administrado oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um veículo edível assimilável. O composto (e outros ingredientes), caso se pretenda) pode também ser incluído numa cápsula de gelatina dura ou macia, prensado em comprimidos ou incorporado directamente na dieta do indivíduo. Para a administração terapêutica oral, os anticorpos anti-MAdCAM podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolachas e similares. Para administrar um composto do invento por uma outra administração que não a parentérica, pode ser necessário revestir o composto ou coadministrá-lo com um material para prevenir a sua inactivação.

As composições do invento podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade

profilaticamente eficaz" de um anticorpo ou porção de ligação ao antigénio do invento. Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários para se conseguir o resultado terapêutico pretendido. Uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo ou porção de anticorpo pode variar de acordo com factores tais como estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo e a capacidade do anticorpo ou porção do anticorpo para induzir uma resposta pretendida no indivíduo. Uma quantidade terapêuticamente eficaz é igualmente uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo ou porção do anticorpo sejam ultrapassados pelos efeitos terapêuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para se conseguir o resultado profilático pretendido. Tipicamente, uma vez que a dose profilática é usada em indivíduos antes ou numa fase precoce da doença, a quantidade profilaticamente eficaz pode ser inferior à quantidade terapêuticamente eficaz.

Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar a resposta óptima pretendida (e.g., uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, pode ser administrado um único bolus, podem ser administradas várias doses divididas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parentéricas na forma unitária de dosagem para facilitar a administração e uniformizar a

dosagem. A forma de dosagem unitária refere-se aqui a unidades fisicamente discretas adequadas a dosagens unitárias para o mamífero a ser tratado; cada unidade contendo uma quantidade pré-determinada de composto activo calculado para produzir o efeito terapêutico em associação com o veículo farmacêutico necessário. A especificação das formas de dosagem unitárias do invento são ditadas e directamente dependentes (a) das características únicas do anticorpo anti-MAdCAM ou porção do mesmo e do efeito terapêutico ou profilático particular a ser atingido e (b) das limitações inerentes na área da formulação de compostos de tal anticorpo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Um gama exemplificativa não limitante de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo ou porção do anticorpo do invento é 0,025 a 50 mg/kg, mais de preferência, 0,1 a 50 mg/kg, mais de preferência 0,1-25, 0,1 a 10 ou 0,1 a 3 mg/kg. Nalgumas formas de realização, a formulação contem 5 mg/ml de anticorpo num tampão de acetato de sódio 20 mM, pH 5,5, NaCl 140 mM e 0,2 mg/ml de polissorbato 80. Deve-se notar que os valores de dosagem podem variar com o tipo e gravidade da condição a ser aliviada. É ainda entendido que para qualquer indivíduo particular, regimes de dosagem específicos deverão ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade do indivíduo e com a avaliação profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições e que as gamas de dosagem aqui descritas sejam apenas exemplificativas e não destinadas a limitar o âmbito ou prática da composição reivindicada.

Um outro aspecto do presente invento proporciona kits compreendendo um anticorpo anti-MAdCAM ou porção de anticorpo do invento ou uma composição compreendendo tal anticorpo. Um kit pode incluir, para além do anticorpo ou composição, agentes de diagnóstico ou terapêuticos. Um kit pode igualmente conter instruções para uso num método de diagnóstico ou terapêutico. Numa forma de realização preferida, o kit inclui o anticorpo ou uma composição compreendendo o mesmo e um agente de diagnóstico que pode ser usado num método descrito abaixo. Numa outra forma de realização preferida, o kit inclui o anticorpo ou uma composição compreendendo o mesmo e um ou mais agentes terapêuticos que podem ser usados num método descrito abaixo.

#### *Terapia génica*

As moléculas de ácido nucleico do presente invento podem ser administradas a um doente necessitado através de terapia génica. A terapia pode ser *in vivo* ou *ex vivo*. Numa forma de realização preferida, as moléculas de ácido nucleico codificadoras de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve são administradas a um doente. Numa forma de realização mais preferida, as moléculas de ácido nucleico são administradas de forma que sejam estavelmente integradas nos cromossomas das células B devido a estas células serem especializadas na produção de anticorpos. Numa forma de realização preferida, as células B precursoras são

transfectadas ou infectadas *ex vivo* e retransplantadas num doente necessitado. Numa outra forma de realização, as células B precursoras ou outras células são infectadas *in vivo* usando um vírus recombinante conhecido por infectar o tipo celular de interesse. Vectores típicos usados para a terapia génica incluem lipossomas, plasmídeos e vectores virais. São exemplos de vectores virais os retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados. Após infecção *in vivo* ou *ex vivo*, os níveis de expressão de anticorpos podem ser monitorizados colhendo uma amostra do doente tratado e usando-a em qualquer imunoensaio conhecido na área ou aqui discutido.

Numa forma de realização preferida, o método de terapia génica compreende os passos de administração de uma molécula de ácido nucleico isolada codificadora da cadeia pesada ou uma porção de ligação ao antigénio da mesma de um anticorpo anti-MAdCAM e expressão da molécula de ácido nucleico. Numa outra forma de realização preferida, o método de terapia génica compreende os passos de administração de uma molécula de ácido nucleico isolada codificadora da cadeia leve ou de uma porção de ligação ao antigénio da mesma de um anticorpo anti-MAdCAM e expressão da molécula de ácido nucleico. Num método mais preferido, o método de terapia génica compreende os passos de administração de uma molécula de ácido nucleico isolada codificadora da cadeia pesada ou de uma porção de ligação ao antigénio da mesma e de uma molécula de ácido nucleico isolada codificadora da cadeia leve ou de uma porção de ligação ao antigénio da



mesma de um anticorpo anti-MAdCAM do invento e expressão das moléculas de ácido nucleico. O método de terapia génica pode também compreender o passo de administração de um outro agente anti-inflamatório ou imunomodulador.

#### Métodos de diagnóstico com utilidade

Os anticorpos anti-MAdCAM podem ser usados para detectar MAdCAM numa amostra biológica *in vitro* ou *in vivo*. Os anticorpos anti-MAdCAM podem ser usados num imunoensaio convencional, incluindo sem limites um ELISA, um RIA, FACS, imuno-histoquímica de tecidos, transferência Western ou imunoprecipitação. Os anticorpos anti-MAdCAM do invento podem ser usados para detectar MAdCAM de primatas do Velho Mundo tais como macacos cinomolgos e macacos resos, chimpanzés e gibões. O invento proporciona um método para a detecção de MAdCAM numa amostra biológica compreendendo o contacto de uma amostra biológica com um anticorpo anti-MAdCAM do invento e detecção do anticorpo ligado a MAdCAM até ao ponto em que este está incluído nas reivindicações apensas. Numa forma de realização, o anticorpo anti-MAdCAM é directamente derivatizado com uma marca detectável. Numa outra forma de realização, o anticorpo anti-MAdCAM (o primeiro anticorpo) é não marcado e um segundo anticorpo ou outra molécula que se pode ligar ao anticorpo anti-MAdCAM é marcada. Como é do conhecimento dos familiarizados com a área, um segundo anticorpo é escolhido para se ligar especificamente à espécie específica e classe do primeiro anticorpo. Por exemplo, se o anticorpo anti-MAdCAM for uma

IgG humana, então o anticorpo secundário pode ser um anti-IgG humano. Outras moléculas que se podem ligar a anticorpos incluem, sem limites, Proteína A e Proteína G, ambas estão disponíveis comercialmente, e.g. da Pierce Chemical Co.

Marcas adequadas para o anticorpo secundário foram descritas *supra* e incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, agentes magnéticos e materiais radioactivos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e abidina/biotina, exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol, um exemplo de um agente magnético inclui gadolínio; e exemplos de materiais radioactivos adequados incluem  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^3\text{H}$ .

Numa forma de realização alternativa, MAdCAM pode ser testado numa amostra biológica através de um imunoensaio de competição usando padrões de MAdCAM marcados com uma substância detectável e um anticorpo anti-MAdCAM não marcado. Neste ensaio, a amostra biológica, os padrões MAdCAM marcados e o anticorpo anti-MAdCAM são combinados e é determinada a quantidade de padrão MAdCAM marcado ligado

ao anticorpo não marcado. A quantidade de MAdCAM na amostra biológica é inversamente proporcional à quantidade de MAdCAM marcado ligado ao anticorpo anti-MAdCAM.

Pode-se usar os imunensaio descritos atrás para uma série de fins. Numa forma de realização, os anticorpos anti-MAdCAM podem ser usados para detectar MAdCAM em células em cultura. Numa forma de realização preferida, os anticorpos anti-MAdCAM podem ser usados para determinar o nível de expressão de MAdCAM na superfície celular após tratamento das células com vários compostos. Este método pode ser usado para testar compostos que podem ser usados para activar ou inibir MAdCAM. Neste método, uma amostra de células é tratada com um composto a testar durante um determinado período de tempo enquanto uma outra amostra é deixada sem tratamento, a expressão na superfície celular poderá então ser determinada por citometria de fluxo, imuno-histoquímica, transferência Western, ELISA ou RIA. Ainda, os imunensaio podem ser sobredimensionados para rastreio de elevado número de amostras de forma a testar um grande número de compostos relativamente à activação ou inibição de MAdCAM.

Os anticorpos anti-MAdCAM do invento podem ser igualmente usados para determinar os níveis de MAdCAM num tecido ou em células derivadas do tecido. Numa forma de realização preferida, o tecido é um tecido doente. Numa forma de realização mais preferida, o tecido é trato gastrointestinal inflamado ou uma biopsia do mesmo. Numa

forma de realização preferida do método, um tecido ou biopsia do mesmo é retirado de um doente. O tecido ou biopsia é então usado num imunoensaio para determinar, e.g., os níveis de MAdCAM, os níveis de MAdCAM na superfície celular ou a localização de MAdCAM pelo método atrás discutido. O método pode ser usado para determinar se um tecido inflamado expressa MAdCAM num nível elevado.

O método de diagnóstico atrás descrito pode ser usado para determinar se um tecido expressa níveis elevados de MAdCAM, os quais podem ser indicativos de que o tecido responderá bem ao tratamento com um anticorpo anti-MAdCAM. Ainda, o método de diagnóstico pode também ser usado para determinar se o tratamento com anticorpo anti-MAdCAM (ver abaixo) faz com que um tecido expresse níveis mais baixos de MAdCAM e assim possa ser usado para determinar se o tratamento tem êxito.

Os anticorpos do presente invento podem ser igualmente usados *in vivo* para localizar tecidos e órgãos que expressam MAdCAM. Numa forma de realização preferida, os anticorpos anti-MAdCAM podem ser usados para localizar tecido inflamado. A vantagem dos anticorpos anti-MAdCAM do presente invento é que não dão origem a uma resposta imune quando administrados. O método compreende os passos de administração de um anticorpo anti-MAdCAM ou de uma composição farmacêutica do mesmo a um doente necessitado de tal teste de diagnóstico e sujeição do doente a análise por imagiologia para determinar a localização dos tecidos que

expressam MAdCAM. A análise por imagiologia é conhecida nas áreas médicas e inclui, sem limites, análise de raios X, cintigrafia gama, imagiologia de ressonância magnética (MRI), tomografia de emissão de positrões ou tomografia computadorizada (CT). Numa outra forma de realização do método, obtém-se uma biopsia do doente para determinar se o tecido de interesse expressa MAdCAM em vez de submeter o doente a análise por imagiologia. Numa forma de realização preferida, os anticorpos anti-MAdCAM podem ser marcados com um agente detectável que pode ser visualizado num doente. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com um agente de contraste, como seja o bário, o qual pode ser usado para análise por raios X ou um agente de contraste magnético, como seja um quelato de gadolínio, o qual pode ser usado para MRI ou CT. Outros agentes de marcação incluem, sem limites, isótopos radioactivos, tais como  $^{99}\text{Tc}$ . Numa outra forma de realização, o anticorpo anti-MAdCAM será não marcado e será visualizado através da administração de um segundo anticorpo ou de outra molécula que detectável e que se pode ligar ao anticorpo anti-MAdCAM.

Os anticorpos anti-MAdCAM do invento podem também ser usados para determinar os níveis de MAdCAM solúvel presentes numa amostra de sangue, soro, plasma, ou outro fluido corporal, incluindo mas não estando limitado a fezes, urina, expectoração ou biopsia. Numa forma de realização preferida, o fluido corporal é plasma. O fluido corporal é então usado num imunoensaio para determinar os níveis de MAdCAM solúvel. MAdCAM solúvel pode constituir

uma marca de inflamação gastrointestinal em curso e o método de detecção poderá ser usado como um marcador de diagnóstico para medir a gravidade da doença.

O método de diagnóstico atrás descrito pode ser usado para determinar se um indivíduo expressa níveis elevados de MAdCAM solúvel, o que pode indicar se o indivíduo responderá bem ao tratamento com um anticorpo anti-MAdCAM. Ainda, o método de diagnóstico pode ser igualmente usado para determinar se o tratamento com um anticorpo anti-MAdCAM (ver abaixo) ou outro agente farmacêutico da doença faz com que um indivíduo expresse níveis mais baixos de de MAdCAM e assim possa ser usado para determinar se o tratamento tem êxito.

Inibição da adesão dependente de  $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM por anticorpo anti-MAdCAM:

É descrito um anticorpo anti-MAdCAM que se liga a MAdCAM e inibe a ligação e adesão de células portadoras de integrina  $\alpha_4\beta_7$  ou de outros ligandos cognatos, como a selectina L, a MAdCAM. Numa descrição, o MAdCAM é humano e está numa forma solúvel ou é expresso na superfície de uma célula. Numa outra descrição, o anticorpo anti-MAdCAM é um anticorpo humano. Numa outra descrição, o anticorpo ou porção do mesmo inibe a ligação entre  $\alpha_4\beta_7$  e MAdCAM com um valor de  $IC_{50}$  não superior a 50 nM. Numa descrição, o valor de  $IC_{50}$  não é superior a 5 nM. Numa descrição, o valor de  $IC_{50}$  é inferior a 5 nM. Numa descrição, o valor de  $IC_{50}$  é inferior a 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,04  $\mu\text{g/ml}$  ou 0,03  $\mu\text{g/ml}$ . Tipica-

mente, um valor de  $IC_{50}$  pode ser medido por ELISA ou num ensaio de adesão. Numa descrição, o valor de  $IC_{50}$  é medido por um ensaio de adesão usando células ou tecido que expressam nativamente MAdCAM ou células ou tecido que foram manipuladas para expressarem MAdCAM.

Inibição do recrutamento de linfócitos para  
tecido linfóide associado ao intestino por anticorpos anti-  
MAdCAM

É descrito um anticorpo anti-MAdCAM que se liga a MAdCAM expresso nativamente e inibe a ligação de linfócitos a tecido linfóide gastrointestinal especializado. Numa descrição, o MAdCAM expresso de forma nativa é MAdCAM humano ou de primata e está na forma solúvel ou é expresso na superfície de uma célula. Numa outra descrição, o anticorpo anti-MAdCAM é um anticorpo humano. Numa outra descrição, o anticorpo ou porção do mesmo inibe o recrutamento de linfócitos  $\alpha_4\beta_7^+$  com tropismo para o intestino para tecidos que expressam MAdCAM com um valor de  $IC_{50}$  não superior a 5 mg/Kg. Numa descrição, o valor de  $IC_{50}$  não é superior a 1 mg/kg. Numa outra descrição, o valor de  $IC_{50}$  é inferior a 0,1 mg/kg. Numa descrição o valor de  $IC_{50}$  pode ser determinado através da medição da relação dose efeito no recrutamento de linfócitos do sangue periférico marcados com tecnécio para o trato gastrointestinal usando cintigrafia gama ou tomografia computadorizada. Numa outra descrição, o valor de  $IC_{50}$  pode ser determinado medindo o aumento de linfócitos  $\alpha_4\beta_7^+$  com tropismo para o intestino,

como seja células T de memória  $CD4^+ \alpha_4\beta_7^+$ , mas não lhes estando limitados, no sangue periférico usando citometria de fluxo em função da dose de anticorpo anti-MAdCAM.

Para que este invento possa ser melhor compreendido, são descritos os exemplos que se seguem. Estes exemplos, são apenas para fins ilustrativos e não devem ser considerados de alguma forma como limitantes do âmbito do invento.

#### EXEMPLO 1:

##### Geração de hibridoma produtores de anti-MAdCAM

Os anticorpos do invento foram preparados, testados e seleccionados de acordo com o presente Exemplo.

##### Preparação do imunogénio primário:

Foram preparados dois imunogénios para imunização de murganhos XENOMOUSE™: (i) uma proteína de fusão MAdCAM-Fc de IgG<sub>1</sub> e (ii) membranas celulares preparadas a partir de células estavelmente transfectadas com MAdCAM.

##### (i) Proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc

##### Construção do vector de expressão:

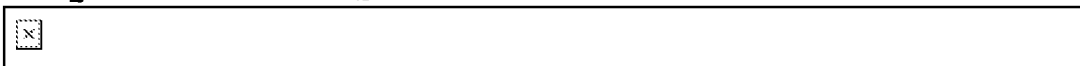
Um fragmento de cDNA EcoRI/BglII codificador do domínio extracelular maduro tipo imunoglobulina de MAdCAM



foi removido de um clone pINCY Incyte (3279276) e clonado nos locais EcoRI/BamHI do vector pIG1 (Simmons, D.L. (1993) in "Cellular Interactions in Development: A Practical Approach", ed. Hartley, D. A. (Oxford Univ. Press, Oxford), pp. 93-127)) para gerar uma fusão com Fc de IgG<sub>1</sub> na mesma grelha de leitura. O inserto resultante foi removido com EcoRI/NotI e clonado em pCDNA3.1+ (Invitrogen). O cDNA de MAdCAM-Fc de IgG<sub>1</sub> no vector foi confirmado por sequenciação. A sequência de aminoácidos da proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc está apresentada abaixo:

Proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc:

**MDFGLALLLAGLLGLLLGQSLQVKPLQVEPPEPVVAVALGASRQLTCRLACADRG**  
**ASVQWRGLDTSLGAVQSDTGRSVLTVRNASLSAAGTRVCVGSCGGRTFQHTVQLL**  
**VYAFPDQLTVSPAALVPGDPEVACTAHKVTVPDPNALSFSLLVGGQLEGAQALG**  
**PEVQEEEEEPQGDVDLFRVTERWRLPPLGTPVPPALYCOATMRLPGLELSHRQA**  
**IPVLHSPTSPEPPDTTSPESPDTTSPESPDTTSQEPPDTTSPQEPDTTSPQEPD**  
**TSPEPPDKTSPEPAPQQGSTHTPRSPGSTRTTRRPEIQPKSCDKTHTCPPCPAPEL**  
**LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT**  
**KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR**  
**EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLD**



Sublinhado: péptido sinal

Negrito: domínio extracelular de MAdCAM

#### Expressão/purificação da proteína recombinante:

As células CHO-DHFR foram transfectadas com o vector pCDN3.1+ contendo o cDNA da proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc e os clones estáveis expressando a proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc foram seleccionados em meio de

Iscove contendo 600 µg/ml de G418 e 100 ng/ml de metotrexato. Para a expressão de proteínas, um bio-reactor de fibras ocas foi semeado com células CHO que expressam estavelmente MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc em meio de Iscove contendo 10% de soro fetal bovino com baixo teor de IgG (Gibco), aminoácidos não essenciais (Gibco), glutamina 2 mM (Gibco), piruvato de sódio (Gibco), 100 µg/ml de G418 e 100 ng/ml de metotrexato e usado para gerar sobrenadante de meio concentrado. A proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc foi purificada a partir do sobrenadante colhido por cromatografia de afinidade. Resumidamente, o sobrenadante foi aplicado numa coluna Hi Trap Protein G Sepharose (5 ml, Pharmacia) (2 ml/min), lavada com Tris 25 mM pH 8, NaCl 150 mM (5 volumes de coluna) e eluída com glicina 100 mM pH 2,5 (1 ml/min), com neutralização imediata das fracções para pH 7,5 com Tris 1M pH 8. As fracções contendo a proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc foram identificadas por SDS-PAGE, reunidas e aplicadas a uma coluna de Sephacryl S100 (Pharmacia), pré-equilibrada com Tris 35 mM pH 6,5, NaCl 150 mM. A filtração em gel foi realizada a 0,35 ml/min, colhendo um pico da proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc em fracções de aproximadamente 3 x 5 ml. Estas amostras foram reunidas e aplicadas numa coluna Resource Q (6 ml, Pharmacia), pré-equilibrada em Bis Tris 35 mM, pH 6,5. A coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de Bis Tris 35 mM pH 6,5, NaCl 150 mM (6 ml/min) e a proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc eluída numa fracção de 4-6 ml com Bis Tris 35 mM, NaCl 400 mM. Nesta fase a proteína estava 90% pura e migrando como uma única banda de aproximadamente 68kD em SDS-PAGE. Para usar como

imunogénio e em todos os passos subsequentes, o material foi sujeito a troca de tampões para HEPES 25 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,, NaCl 100 mM, 50% de glicerol e guardado como alíquotas a -80°C.

(ii) Membranas celulares que expressam estavelmente MAdCAM

Um fragmento SacI/NotI compreendendo os nucleótidos 645-1222 da sequência MAdCAM publicada (Shyjan AM, *et al.*, J Immunol., 156, 2851-7 (1996)) foi amplificado por PCR a partir de uma biblioteca de cDNA do cólon e clonada em locais SacI/NotI do vector pIND-Hygro (Invitrogen). Um fragmento SacI, compreendendo a sequência codificadora 5' adicional foi subclonado nesta construção de pCDNA3.1 MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc para gerar cDNA de MAdCAM de tamanho completo. Um fragmento KpnI/NotI contendo o cDNA de MAdCAM foi então clonado nos locais correspondentes num vector pEF5FRTV5GWCAT (Invitrogen) com substituição da sequência codificadora de CAT. O inserto de cDNA foi verificado por sequenciação e usado em transfecções para gerar clones isolados com expressão estável em células FlpIn NIH 3T3 (Invitrogen) por tecnologia de recombinase Flp, de acordo com as instruções do fabricante. Os clones com expressão estável foram seleccionados pela sua capacidade para suportar a ligação de uma linha celular linfoblastóide B humana  $\alpha_4\beta_7^+$  JY (Chan BM, *et al.*, J. Biol. Chem., 267:8366-70 (1992)), descrita abaixo. Os clones estáveis de células CHO expressando MAdCAM foram preparados da mesma forma, usando células CHO Flpn (Invitrogen).

As células Flpln NIH-3T3 expressando MAdCAM foram crescidas em meio de Eagle modificação de Dulbecco (Gibco), contendo L-glutamina 2 mM, 10% de soro de vitela Donor (Gibco) e 200 µg/ml de higromicina B (Invitrogen) e expandidas em frascos rolantes. As células CHO Flpn expressando MAdCAM foram crescidas em meio Ham's F12/ meio de Eagle modificação de Dulbecco (Gibco) contendo L-glutamina 2 mM, 10% de soro de vitela Donor (Gibco) e 350 µg/ml de higromicina B (Invitrogen) e expandidas em frascos rolantes. As células foram colhidas para usar numa solução não enzimática de dissociação de células (Sigma) e raspagem, lavagem com soro fisiológico tamponado com fosfatos por centrifugação. As membranas celulares foram preparadas a partir do sedimento de células através de dois ciclos de homogeneização com polytron em Bis Tris 25 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 0.015% (p/v) de aprotinina, 100 U/mL de bacitracina e centrifugação. O sedimento final foi ressuspensão no mesmo tampão e o equivalente a  $50 \times 10^6$  células distribuídas em pequenas quantidades por tubos eppendorf de parede espessa e centrifugados a  $>100000g$  para gerar sedimentos de membranas celulares para imunizações de murganhos XenoMouse. O sobrenadante foi decantado e as membranas guardadas em eppendorfs a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem necessárias. A confirmação da expressão da proteína nas membranas celulares foi determinada por SDS-PAGE e transferências Western com um anticorpo de coelho anti-péptido induzido contra os resíduos n-terminais de MAdCAM ([C]-KPLQVEPPEP).

Imunização e geração de hibridomas:

Murganhos XENOMOUSE™ com oito a dez semanas de idade foram imunizados intraperitonealmente ou nas suas patas traseiras com a proteína de fusão recombinante purificada MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc (10 µg/dose/murganho) ou com membranas celulares preparadas a partir de células CHO ou NIH-3T3 expressando estavelmente MAdCAM (10 x 10<sup>6</sup> células/dose/murganho). Esta dose foi repetida cinco a sete vezes ao longo de um período de três a oito semanas. Quatro dias antes da fusão, os murganhos receberam uma injeção final do domínio extracelular de MAdCAM humano em PBS. Os linfócitos do baço e dos nódulos linfáticos dos murganhos imunizados foram fundidos com a linha celular de mieloma não secretória P3-X63-Ag8.653 e foram sujeitos a selecção com HAT como anteriormente descrito (Galfre and Milstein, Methods Enzymol. 73:3-46 (1981)). Um painel de hibridomas todos secretores de anticorpos IgG<sub>2</sub>k e IgG<sub>4</sub>k humanos específicos de MAdCAM foram recuperados e subclonados. Doze subclones de hibridoma, 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 e 9.8.2, produtores de anticorpos monoclonais específicos de MAdCAM foram recuperados e detectados com os ensaios descritos abaixo. As linhas parentais 1.7, 1.8, 6.14, 6.22, 6.34, 6.67, 6.73, 6.77, 7.16, 7.20, 7.26 e 9.8 das quais derivam os subclones das linhas de hibridoma 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 e 9.8. tinham todas actividade anti-MAdCAM.

Ensaaios de ELISA:

A detecção de anticorpos específicos de antígeno em soro de murganho e no sobrenadante de hibridoma foi determinado por ELISA como descrito (Coligan *et al.*, Unit 2.1 "Enzyme-linked immunosorbent assays," in *Current Protocols In Immunology*(1994)) usando a proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc para capturar os anticorpos. Para os animais que foram imunizados com a proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc, os anticorpos foram testados relativamente a reactividade não específica contra IgG<sub>1</sub> humana e quanto à capacidade para se ligarem a células FlpIn CHO MAdCAM por citometria de fluxo.

Num ensaio de ELISA preferido, foram usadas as técnicas que se seguem:

As placas de ELISA foram revestidas durante a noite a 4°C com 100 µl /alvéolo da fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc (4,5 µg/ml) em placas contendo tampão (tampão carbonato/bicarbonato de sódio 100 mM, pH 9,6). Após incubação, o tampão de revestimento foi removido e a placa bloqueada com 200 µl/alvéolo de tampão de bloqueio (5% BSA, 0,1 % Tween 20, em soro fisiológico tamponado com fosfatos) e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora. O tampão de bloqueio foi removido e adicionado 50 µl/alvéolo de sobrenadante de hibridoma ou de outro soro ou sobrenadante (*e.g.*, controlo positivo) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação a placa foi lavada com PBS (3 x 100 µl/alvéolo) e

a ligação do mAb do hibridoma detectada com anticorpos secundários conjugados com HRP (*i.e.* 1:1000 de anticorpos de murganho anti-IgG<sub>2</sub> humana-HRP (SB Cat. No. 9060-05) para anticorpos IgG<sub>2</sub> ou 1:1000 de anticorpos de murganho anti-IgG<sub>4</sub> humana-HRP (Zymed Cat. No. 3840) para anticorpos IgG<sub>4</sub>) diluídos em PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora, lavadas em PBS (3 x 100 µl/alvéolo) e finalmente reveladas com 100 µl de OPD (o-fenilenodiamina (DAKO S2405) + 5 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/12 mL). As placas foram deixadas a revelar 10-12 mins, e a paragem da reacção foi feita com 100 µl de 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As placas foram lidas a 490 nm.

#### Ensaaios de adesão:

Os anticorpos que demonstraram ligação à proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc por ELISA, foram avaliados relativamente à actividade antagonista em ensaios de adesão com células  $\alpha_4\beta_7^+$  JY e (i) proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc ou (ii) células MAdCAM-CHO.

#### (i) Ensaio com a proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc

100 µl de uma solução a 4,5 µg/ml da proteína de fusão purificada MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc em PBS de Dulbecco foi adsorvida a placas de 96 alvéolos de fundo em u Black Microfluor "B" (Dynex #7805) durante a noite a 4°C. As placas revestidas com MAdCAM foram então invertidas e o

excesso de líquido retirado por absorção sobre toalhas de papel, antes do bloqueio a 37°C durante pelo menos 1 hora em 10% BSA/PBS. Durante este tempo, as células JY em cultura foram contadas usando exclusão com azul tripano (deverá ser aproximadamente  $8 \times 10^5$  células/ml) e  $20 \times 10^6$  células/placa de ensaio pipetadas para um tubo de centrifuga de 50 ml. As células JY foram cultivadas em meio RPMI1640 (Gibco), contendo L-glutamina 2 mM e 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Life Technologies #10108-165) e semeadas a  $1-2 \times 10^5$ /ml cada 2-3 dias para evitar a diferenciação da cultura. As células foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 (Gibco) contendo L-glutamina 2 mM (Gibco) por centrifugação (240 g), ressuspensando o sedimento celular final a  $2 \times 10^6$  células/ml em RPMI 1640 para adição de Calceína AM. A Calceína AM (Molecular Probes #C-3099) foi adicionada às células numa diluição de 1:200 em DMSO (concentração final de aproximadamente 5  $\mu$ M) e as células protegidas da luz durante a incubação (37°C durante 30 mins). Durante este passo de incubação das células os anticorpos a serem testados foram diluídos como se segue: para o teste com uma única dose, os anticorpos foram preparados a 3  $\mu$ g/ml final) em 0,1 mg/ml de BSA (Sigma #A3059) em PBS; para as curvas de IC<sub>50</sub>, os anticorpos foram diluídos em 0,1 mg/ml de BSA/PBS, com 3  $\mu$ g/ml (1  $\mu$ g/ml final) sendo a concentração máxima, depois duplicando as diluições (proporção de 1:2) ao longo da placa. O alvéolo final da fila foi usado para determinar a ligação total, assim foi usado 0,1 mg/ml de BSA em PBS.



Após bloqueio, os conteúdos das placas foram retirados e adicionados 50 µl de anticorpos/controles a cada alvéolo e a placa incubada a 37°C durante 20 minutos. Durante este tempo, as células JY cheias de calceína foram lavadas uma vez com meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e uma vez com 1 mg/ml de BSA/PBS por centrifugação, ressuspensão do sedimento de células final a  $1 \times 10^6$ /ml em 1 mg/ml de BSA/PBS. 100 µl de células foram adicionados a cada alvéolo da placa de fundo em U, a placa foi selada, centrifugada rapidamente (1000 rpm durante 2 min) e a placa depois incubada a 37°C durante 45 min. No final deste tempo, as placas foram lavadas com um lavador de placas Skatron e medida a fluorescência com um leitor Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Reader ( $\lambda$  de excitação 485 nm,  $\lambda$  de emissão 535 nm contagem a partir do topo, 8 mm a partir do topo, durante 0,1 seg com abertura de emissão normal). Para cada concentração de anticorpo, a percentagem de adesão foi expressa como uma percentagem de resposta máxima de fluorescência na ausência de qualquer anticorpo menos a fluorescência associada a ligação inespecífica. O valor de IC<sub>50</sub> foi definido como a concentração de anticorpo anti-MAdCAM à qual a resposta de adesão diminui em 50% a resposta observada na ausência de anticorpo anti-MAdCAM. Os anticorpos que foram capazes de inibir a ligação de células JY à fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc com um valor de IC<sub>50</sub> <0,1 µg/ml, foram considerados como tendo forte actividade antagonista e foram usados no ensaio de adesão com MAdCAM-CHO. Os doze Abs testados mostraram forte actividade antagonista (Tabela 3). Os anticorpos monoclonais 1.7.2, 1.8.2, 7.16.6, 7.20.5

e 7.26.4 derivaram das linhagens IgG<sub>2</sub>k, e os anticorpos monoclonais 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1 e 9.8.2 derivaram das linhagens IgG<sub>4</sub>k.

(ii) Ensaio de adesão das células MAdCAM-CHO

Células JY foram cultivadas como atrás descrito. As células CHO expressando MAdCAM foram geradas com a construção de cDNA pEF5FRT MAdCAM e usando a tecnologia da recombinase Flp (Invitrogen) como descrito atrás. Os clones isolados estáveis de células CHO expressando MAdCAM foram seleccionados com base na sua capacidade para suportar a adesão de células JY e a ligação por citometria de fluxo do anticorpo anti-péptido de coelho, induzido contra o extremo N de MAdCAM e descrito atrás. As células CHO que expressam MAdCAM foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Gibco #21331-010) contendo L-glutamina 2 mM, 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 350 µg/ml de higromicina B (Invitrogen), passadas a 1:5 cada 2/3 dias. Para o ensaio de adesão, as células CHO expressando MAdCAM foram semeadas a 4 x 10<sup>4</sup> células/alvéolo em placas de 96 alvéolos preta de fundo transparente (Costar #3904) em 200 µl de meio de cultura e crescidas durante a noite a 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

No dia seguinte, o sobrenadante dos hibridomas ou do anticorpo monoclonal foi diluído a partir de uma concentração de partida de 30 µg/ml (equivalente a uma concentração final de 10 µg/ml) em 1 mg/ml de BSA/PBS, como

atrás descrito. Para as células MAdCAM CHO, os conteúdos das placas foram removidos e adicionados 50  $\mu$ l de anticorpos/controles a cada alvéolo e a placa incubada a 37°C durante 20 minutos. O último alvéolo da fila foi usado para determinação da ligação total, assim usou-se 0,1 mg/ml de BSA em PBS. As células JY cheias de calceína AM numa concentração final a  $1 \times 10^6$ /ml em 1 mg/ml de BSA/PBS foram preparadas como atrás descrito, depois 100  $\mu$ l foram adicionados à placa após o período de incubação de 20 min com o anticorpo. A placa foi depois incubada a 37°C durante 45 min. No final deste tempo, em seguida lavada com um lavador de placas Tecan (PW384) e medida a fluorescência com o leitor de placas como atrás descrito. Para cada concentração de anticorpo, a percentagem de adesão foi expressa como uma percentagem de resposta máxima de fluorescência na ausência de qualquer anticorpo menos a fluorescência associada a ligação inespecífica. Os anticorpos que foram capazes de inibir a ligação de células JY às células MAdCAM CHO com um valor de  $IC_{50} < 0,1 \mu$ g/ml, foram considerados como tendo forte actividade antagonista. Como anteriormente, o valor de  $IC_{50}$  é definido como a concentração de anticorpo à qual a resposta de adesão teve um decréscimo para 50% da resposta na ausência de anticorpo anti-MAdCAM. As potências de  $IC_{50}$  para 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 e 9.8.2 neste ensaio estão descritas abaixo na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de IC<sub>50</sub> dos anticorpos anti-MAdCAM exemplificados

| Clone  | Fusão MAdCAM<br>IgG <sub>1</sub> Fc Média<br>IC <sub>50</sub> (µg/ml) | Ensaio MAdCAM<br>FlpIn CHO Fc<br>Média IC <sub>50</sub><br>(µg/ml) |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 1.7.2  | 0.030 ± 0.011                                                         | 6 0.502 ± 0.280                                                    |
| 1.8.2  | 0.027 ± 0.011                                                         | 4 0.424 ± 0.107                                                    |
| 7.16.6 | 0.019 ± 0.009                                                         | 7 0.389 ± 0.093                                                    |
| 7.20.5 | 0.025 ± 0.027                                                         | 7 0.387 ± 0.202                                                    |
| 7.26.4 | 0.021 ± 0.040                                                         | 4 0.574 ± 0.099                                                    |
| 6.14.2 | 0.011 ± 0.005                                                         | 4 0.291 ± 0.096                                                    |
| 6.22.2 | 0.018 ± 0.011                                                         | 4 0.573 ± 0.168                                                    |
| 6.34.2 | 0.013 ± 0.008                                                         | 4 0.285 ± 0.073                                                    |
| 6.67.1 | 0.013 ± 0.070                                                         | 4 0.298 ± 0.115                                                    |
| 6.73.2 | 0.020 ± 0.010                                                         | 4 0.369 ± 0.103                                                    |
| 6.77.1 | 0.022 ± 0.004                                                         | 4 0.520 ± 0.100                                                    |
| 9.8.2  | 0.020 ± 0.050                                                         | 4 0.440 ± 0.342                                                    |

IgG2

IgG4

Para medir a potência antagonista de mAbs anti-MAdCAM em ensaios baseados em fluxo, em condições de pressão de fricção destinadas a simular o ambiente microvascular nas vénulas endoteliais altas que servem o tecido linfóide associado ao intestino, as células CHO expressando MAdCAM foram semeadas em microlâminas de vidro (50 x 4 mm) e deixadas a aderir para formar uma monocamada confluenta (cerca de  $2,5 \times 10^5$  células). As células foram então incubadas com mAb purificado por afinidade numa larga gama de concentrações (0,1-10 µg/ml) durante 20 mins a 37°C, antes de serem ligadas ao sistema de ensaio de fluxo. Como controlo nega-

tivo foi usado um anticorpo do mesmo isotipo para IgG<sub>2</sub> ou IgG<sub>4</sub> (10 µg/ml). Os linfócitos de sangue periférico (PBLs) de dadores normais foram perfundidos sobre a monocamada de células a uma força de fricção constante de 0,05 Pa. As experiências foram editadas em vídeo e adesão total de linfócitos (rolamento + adesão firme) foi calculada. Todos os anticorpos monoclonais testados demonstraram ser fortes antagonistas nas condições descritas.

(iii) Ensaaios de Stamper-Woodruff

Para visualizar os vasos MadCAM<sup>+</sup>, foi gerado mAb anti-MAdCAM biotinilado em 1-2 mg de proteína purificada por afinidade, usando um excesso molar de biotina-NHS (Pierce) em soro fisiológico tamponado com fosfatos, de acordo com as instruções do fabricante. A reacção foi deixada correr à temperatura ambiente (30 min) e removido o sal com uma coluna PD-10 (Pharmacia) e determinada a concentração proteica.

O nódulo linfático de fígado normal foi removido de um órgão dador, congelado rapidamente em azoto líquido e guardado a -70°C até ser usado. Secções de crióstato de 10 µm foram cortadas, secas ao ar sobre lâminas revestidas com poli-L lisina e fixadas em acetona antes do ensaio. As secções foram bloqueadas usando o sistema de bloqueio avidina-biotina (DAKO) e depois incubadas com mAb anti-MAdCAM biotinilado numa larga gama de concentrações (1-50

µg/ml) à temperatura ambiente (2 hrs). Como controlo negativo usou-se um anticorpo do mesmo isotipo do mAb IgG<sub>2</sub> ou de IgG<sub>4</sub> (50 µg/ml) e como controlo positivo um anticorpo bloqueador anti-β<sub>7</sub> (50 µg/ml).

Os linfócitos do sangue periférico, colhidos de doadores normais, foram marcados com um mAb anti-CD2 humano (DAKO) para permitir a subsequente visualização de células aderentes.  $5 \times 10^5$  PBLs foram adicionados a cada secção de nódulo linfático e incubados durante 30 minutos antes de serem suavemente levados para evitar o descolamento das células aderentes. As secções foram então novamente fixadas e incubadas com mAb anti-MAdCAM biotinilado (10 µg/ml), seguido de anticorpos de cabra anti-mAb de murganho biotinilado (para reconhecer PBLs CD2 marcados e os vasos MAdCAM<sup>+</sup> não corados) e depois streptABcomplex/HRP (DAKO). Finalmente, os vasos MAdCAM<sup>+</sup> & PBLs CD2 marcados foram visualizados pela adição do substrato DAB (DAKO) às secções, com um produto de reacção castanho mostrando as áreas de coloração positiva. A adesão dos linfócitos foi quantificada pela contagem do número de linfócitos que aderiram a 50 vasos MAdCAM<sup>+</sup> dos tratos portais, veias ou sinusóides. Os dados, expressos como valores médios, foram então normalizados relativamente à percentagem de adesão dos PBLs na ausência de qualquer anticorpo considerada como 100%. Os dados foram compilados com base em n=3 diferentes doadores de PBLs e para diferentes doadores de nódulos linfáticos do fígado. Os dados representativos para os

anticorpos monoclonais purificados biotinilados 1.7.2 e 7.16.6 estão descritos na Figura 4 comparando com um controlo de anticorpo bloqueador anti- $\beta_7$ .

Ensaio de selectividade:

VCAM e a fibronectina são homólogos, em termos estruturais e de sequências, de MAdCAM. Os mAbs anti-MAdCAM purificados por afinidade foram testados relativamente à especificidade para MAdCAM através da determinação da sua capacidade para bloquear a ligação de células T Jurkat  $\alpha_4\beta_1^+/\alpha_5\beta_1^+$  (ATCC) à sua molécula de adesão celular cognata. 100  $\mu$ l de uma solução do fragmento de ligação da célula à fibronectina (110 kD, Europa Bioproducts Ltd, Cat. No. UBF4215-18) ou VCAM (Panvera) em PBS de Dulbecco foi adsorvido a placas de 96 alvéolos de fundo em U Black Microfluor "B" (Dynex #7805) durante a noite a 4°C. As placas revestidas foram então invertidas e o excesso de líquido retirado por absorção com papel, antes do bloqueio a 37°C durante pelo menos 1 hora em 10% BSA/PBS. Durante este tempo as células T Jurkat em cultura foram contadas usando exclusão com azul tripiano e cheias com o corante calceína AM como anteriormente descrito para as células JY. Os anticorpos a serem testados foram diluídos a partir de uma concentração máxima de 10  $\mu$ g/ml em 0,1 mg/ml de BSA em PBS. O último alvéolo da fila foi usado para determinação da ligação total, de forma que foi usado 0,1 mg/ml de BSA em PBS. Echistatin (Bachem, Cat. No. H-9010) preparado em

PBS foi usado numa concentração máxima de 100 nM para bloquear a interacção  $\alpha_5\beta_1$ /fibronectina. Um mAb anti-CD106 (Clone 51-10C9, BD Pharmingen Cat. 555645) na concentração máxima de 1  $\mu$ g/ml foi usado para bloquear a interacção  $\alpha_4\beta_1$ /VCAM.

Após bloqueio, o conteúdo da placa foi retirado e adicionados 50  $\mu$ l de anticorpos/controles a cada alvéolo e a placa incubada a 37°C durante 20 minutos. Células T Jurkat cheias com calceína foram lavadas uma vez como anteriormente, ressuspensando o sedimento final para  $1 \times 10^6$ /ml em 1 mg/ml de BSA/PBS. 100  $\mu$ l de células foram adicionados a cada alvéolo da placa de fundo em U, a placa foi selada, centrifugada rapidamente (1000 rpm durante 2 min) e a placa foi depois incubada a 37°C durante 45 min. No final deste tempo, as placas foram lavadas com um lavador de placas Skatron e medida a fluorescência com um leitor Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Reader ( $\lambda$  de excitação 485 nm,  $\lambda$  de emissão 535 nm contagem a partir do topo, 8 mm a partir do topo, durante 0,1 seg com abertura de emissão normal). Para cada concentração de anticorpo, o grau de inibição está expresso abaixo pictoricamente, na Tabela 4 (- inibição da adesão negligível, \*\*\* inibição completa da adesão). Todos os mAbs exemplificados são anátagonistas anti-MAdCAM fortes e selectivos, demonstrando substancialmente mais de 100 vezes de selectividade para MAdCAM relativamente a VCAM e fibronectina.



Tabela 4. Selectividade comparativa do anticorpo anti-MAdCAM para MAdCAM relativamente a outras moléculas de adesão celular, fibronectina e VCAM

| Clone  | Inibição no ensaio $\alpha\beta_1$ /fibronectina | Inibição no ensaio $\alpha\beta_1$ /VCAM (10 $\mu$ g/ml) | Inibição no ensaio $\alpha\beta_1$ /MAdCAM (10 $\mu$ g/ml) |
|--------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1.7.2  | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 1.8.2  | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 7.16.6 | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 7.20.5 | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 7.26.4 | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 6.14.2 | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 6.22.2 | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 6.34.2 | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 6.67.1 | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 6.73.2 | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 8.77.1 | -                                                | -                                                        | ***                                                        |
| 9.8.2  | -                                                | -                                                        | ***                                                        |

|      |
|------|
| IgG2 |
| IgG4 |

Os hibridomas foram depositados na European Collection of Cell Cultures (ECACC), H.P.A at CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG em 9 de Setembro 2003 com os seguintes números de depósito:

| Hibridoma | Depósito No. |
|-----------|--------------|
| 1.7.2     | 03090901     |
| 1.8.2     | 03090902     |
| 6.14.2    | 03090903     |
| 6.22.2    | 03090904     |
| 6.34.2    | 03090905     |

|        |          |
|--------|----------|
| 6.67.1 | 03090906 |
| 6.73.2 | 03090907 |
| 6.77.1 | 03090908 |
| 7.16.6 | 03090909 |
| 7.20.5 | 03090910 |
| 7.26.4 | 03090911 |
| 9.8.2  | 03090912 |

### **EXEMPLO II:**

Determinação das constantes de afinidade ( $K_d$ ) de anticorpos monoclonais totalmente humanos anti-MAdCAM por BIAcore

Realizámos medições de afinidade dos anticorpos purificados por ressonância de plasmões de superfície usando o instrumento BIAcore 3000, seguindo os protocolos do fabricante.

#### *Protocolo 1*

Para realizar as análises cinéticas, preparou-se uma superfície de alta densidade de anticorpo de murganho anti-(IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>) humanas sobre um sensor BIAcore CM5 usando acoplagem de amins de rotina. Os sobrenadantes dos hibridomas foram diluídos 10, 5, 2 vezes em tampão de corrida HBS-P (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,005% tensioactivo P20) contendo 100 µg/ml de BSA e 10 mg/ml de carboximetildextrano ou usado bruto. Cada mAb foi capturado

numa superfície separada usando um tempo de contacto de 1 min e uma lavagem de 5 min para estabilização da linha de base do mAb. A proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc (141 nM) foi então injectada em todas as superfícies durante um minuto, seguido de uma dissociação de 3 minutos. Os dados foram normalizados para a quantidade de anticorpo capturado em cada superfície e avaliado com um ajuste global Langmuir 1:1, usando modelos de da linha de base disponíveis no programa BIAevaluation fornecido pela BIAcore.

#### *Protocolo 2*

Os mAbs purificados por afinidade foram imobilizados na camada de dextrano de um biosensor CM5 usando acoplagem com amina. Os circuitos integrados foram preparados usando tampão acetato pH 4,5 como tampão de imobilização e densidades proteicas de 1,5-5,5 kRU foram atingidos. Amostras da proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc em tampão de amostra foram preparadas em concentrações que variaram entre 0,2 e 55 nM (uma solução 0 nM compreendendo tampão de corrida sozinho foi incluída como referência zero). As amostras distribuídas ao acaso e injectadas em duplicado durante 3 min cada através de 4 células de fluxo HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% Tensioactivo P20= como tampão de corrida. Um fluxo de 100 µl/min foi usado para minimizar os limites de transporte de massa. A dissociação da proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc foi monitorizada durante 180 mins, a superfície regenerada por uma injeção de 6 seg de 25 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50 µL/min), ou 10

mM (6.22.2), 20 mM (6.67.1, 6.73.2, 6.77.1) a 25 mM (6.34.2) e 45 mM NaOH (6.14.2) e os dados analisados com o pacote informático BIAevaluation (v3.1).

A Tabela 5 descreve as medições de afinidade de anticorpos anti-MAdCAM representativos do presente invento:

Tabela 5. Determinação da constante de afinidade,  $K_D$ , por ressonância de plasmões de superfície (BIAcore)

| CLONE  | Protocolo 1       |                      |            | Protocolo 2       |                      |            |
|--------|-------------------|----------------------|------------|-------------------|----------------------|------------|
|        | $k_{on}$ (1/Ms)   | $k_{off}$ (1/s)      | $K_D$ (pM) | $k_{on}$ (1/Ms)   | $k_{off}$ (1/s)      | $K_D$ (pM) |
| 1.7.2  | $2.4 \times 10^5$ | $1 \times 10^{-5}$   | 42         | $5.5 \times 10^3$ | $1.3 \times 10^{-7}$ | 23.6       |
| 1.8.2  | $2.9 \times 10^5$ | $1 \times 10^{-5}$   | 35         | $1.8 \times 10^5$ | $2.3 \times 10^{-5}$ | 128        |
| 7.16.6 | $1.5 \times 10^6$ | $2.2 \times 10^{-6}$ | 1.5        | $2.9 \times 10^5$ | $1.4 \times 10^{-6}$ | 4.8        |
| 7.20.5 | $4.5 \times 10^5$ | $1.9 \times 10^{-6}$ | 42.2       | $1.6 \times 10^5$ | $1.2 \times 10^{-6}$ | 75         |
| 7.26.4 | $9.6 \times 10^5$ | $2.6 \times 10^{-4}$ | 271        | $1.5 \times 10^5$ | $1.2 \times 10^{-6}$ | 80         |
| 6.14.2 | $1.3 \times 10^5$ | $1 \times 10^{-5}$   | 7.7        | $5 \times 10^5$   | $< 5 \times 10^{-6}$ | $< 10$     |
| 6.22.2 | $1.5 \times 10^6$ | $1.4 \times 10^{-6}$ | 9.3        | $2.3 \times 10^5$ | $8.7 \times 10^{-7}$ | 3.8        |
| 6.34.2 | $1.2 \times 10^6$ | $1.9 \times 10^{-6}$ | 15.8       | $3.3 \times 10^5$ | $< 5 \times 10^{-6}$ | $< 15$     |
| 6.67.1 | $5.9 \times 10^5$ | $1 \times 10^{-5}$   | 17         | $2.4 \times 10^5$ | $< 5 \times 10^{-6}$ | $< 20$     |
| 6.73.2 | $1.4 \times 10^5$ | $1.3 \times 10^{-4}$ | 93         |                   |                      |            |
| 6.77.1 | $1.5 \times 10^5$ | $1 \times 10^{-6}$   | 6.7        |                   |                      |            |
| 9.8.2  | $2.3 \times 10^6$ | $2.3 \times 10^{-4}$ | 100        | $4.4 \times 10^5$ | $1.4 \times 10^{-6}$ | 32.5       |

|      |
|------|
| IgG2 |
| IgG4 |

A análise cinética indica que os anticorpos preparados de acordo com o invento possuem elevadas afinidade e fortes constantes de ligação para o domínio extracelular de MAdCAM.

EXEMPLO III:Identificação da selectividade de epitopos e reactividade cruzada de espécies de mAbs anti-MAdCAM

Os anticorpos reconhecem epitopos expostos na superfície de antigénios como regiões de sequência linear (primária) ou de sequência estrutural (secundária). Compartimentação de epitopos com Luminex, compartimentação com BIAcore e análise imuno-histoquímica de espécies foram usados concertadamente para definir o panoram de epitopos funcionais dos anticorpos anti-MAdCAM.

Compartimentação de epitopos baseada em Luminex:

Esferas conjugadas com MxhlgG 2,3.4 (Calbiochem M1 1427) foram acopladas ao anticorpo primário anti-MAdCAM desconhecido. Adicionámos 150 µl de diluição do anticorpo primário desconhecido (0,1 µg/ml diluído em meio de hibridoma) ao alvéolo de uma placa de cultura de 96 alvéolos. As esferas foram agitadas suavemente com vortex e diluídas em sobrenadante para uma concentração de  $0,5 \times 10^5$  esferas/ml. As esferas foram incubadas no sobrenadante num agitador durante a noite no escuro a 4°C.

Cada um dos alvéolos de uma placa com filtro de microtitulação de 96 alvéolos (Millipore # MABVN1250) foi pré-molhada pela adição de 200 µl de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween 20) e removido por aspiração. Em

seguida, 50 µl/alvéolo do stock de  $0,5 \times 10^5$  esferas/ml foi adicionado à placa com filtro e os alvéolos foram lavados com tampão de lavagem (2 x 100 µl/alvéolo). Adicionou-se 60 µl/alvéolo de antigénio MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc diluído em meio de hibridoma (0,1 µg/ml). As placas foram cobertas e incubadas à temperatura ambiente com agitação suave durante uma hora. Os alvéolos foram lavados duas vezes pela adição de 100 µl/alvéolo de tampão de lavagem seguido de aspiração. Em seguida, adicionámos 60 µl/alvéolo de anticorpo secundário anti-MAdCAM desconhecido diluído em meio de hibridoma (0,1 µg/ml). As placas foram agitadas à temperatura ambiente no escuro durante duas horas. Em seguida os alvéolos foram lavados duas vezes pela adição de 100 µl/alvéolo de tampão de lavagem seguido de aspiração. Em seguida, adicionou-se 60 µl/alvéolo de MxhIgG 2,3,4 biotinilado (0,5 µg/ml). As placas foram agitadas à temperatura ambiente no escuro durante uma hora. Os alvéolos foram lavados duas vezes pela adição de 100 µl/alvéolo de tampão de lavagem seguido de aspiração. A cada alvéolo, adicionou-se 60 µl de 1 µg/ml de MxhIgG 2,3,4 Streptavidin-PE (Pharmacia #554061) diluído em meio de hibridoma. As placas foram agitadas à temperatura ambiente no escuro durante vinte minutos. Os alvéolos foram lavados pela adição de 100 µl/alvéolo de tampão de lavagem seguido de aspiração. Em seguida, cada alvéolo foi ressuspensionado em 80 µl de tampão de bloqueio (PBS com 0,05% de albumina sérica bovina, 0,1% TWEEN e 0,01% de Thimerosal) cuidadosamente pipetado para cima e para baixo para ressuspender as esferas.

Usando Luminex 100 e o programa informático apenas (Luminex® Corporation) as placas foram lidas para determinar as leituras de luminescência. Baseado nos dados de luminescência obtidos para os vários anticorpos anti-MAdCAM testados, os anticorpos anti-MAdCAM foram agrupados de acordo com as suas especificidades de ligação. Os anticorpos anti-MAdCAM que foram testados caem numa série de compartimentos de epitopos, representados na Tabela 8.

#### Compartimentação BIAcore:

Num método semelhante ao atrás descrito, BIAcore pode também ser usado para determinar a exclusividade de epitopos dos anticorpos anti-MAdCAM exemplificados por este invento. Nove clones de anticorpos anti-MAdCAM, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1, 7.20.5, 9.8.2, 1.7.2, 7.26.4 e 7.16.6, foram imobilizados na camada de dextrano de células de fluxo separadas de um circuito integrado de biosensor CM5 usando acoplagem com amina. O tampão de imobilização foi tampão acetato 10 mM pH 4,5 (clones 6.22.2, 6.34.2, 7.20.5, 9.8.2, 1.7.2, 7.26.4 e 7.16.6) ou tampão acetato 10 mM pH 5.5 (clones 6.67.1 e 6.77.1). Uma densidade proteica de aproximadamente 3750 RU foi conseguida em todos os casos. A desactivação dos ésteres de H-hidro-siccinimida que não reagiram foi realizada usando hidrocloreto de etanolamina 1M, pH 8,5.

A proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc foi diluída

para uma concentração de 1,5 µg/ml (aproximadamente 25 nM) em tampão de corrida HBS-EP (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% Polissorbato 20). Foi então injectada através da primeira célula de fluxo, num volume de 50 µl a uma velocidade de 50 µl/min. Após a injeção estar completa, a primeira sonda de anticorpo foi adicionada à mesma célula de fluxo. Todos os anticorpos a testar foram diluídos para uma concentração de aproximadamente 20 µg/ml em HBS-EP e também injectados num volume de 50 µl a um fluxo de 5 µl/min. Quando não foi observada ligação do anticorpo a testar, o clone a testar seguinte foi injectado imediatamente a seguir. Quando ocorreu ligação, a superfície do sensor foi regenerada para remover a proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc e o anticorpo testado. Foi usada uma variedade de soluções de regeneração dependendo do anticorpo imobilizado e do anticorpo a testar presente. Na Tabela 6 está apresentado um sumário das condições de regeneração usadas.

Tabela 6. Sumário das condições de regeneração usadas para realizar o mapeamento de epitopos BIAcore

| Anticorpo imobilizado | Anticorpo a ser removido | Solução de regeneração | Volume de injeção |
|-----------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|
| 7.16.6                | 6.22.2                   | Ácido fosfórico 40 mM  | 20 µl             |
|                       | 6.34.2                   | Ácido fosfórico 40 mM  | 40 µl             |
|                       | 7.02.5                   | Ácido fosfórico 40 mM  | 20 µl             |
| 6.77.1                | 9.8.2                    | Ácido fosfórico 40 mM  | 10 µl             |
|                       | 1.7.2                    | Ácido fosfórico 40 mM  | 5 µl              |
|                       | 7.16.6                   | Ácido fosfórico 40 mM  | 10 µl             |



(continuação)

| Anticorpo<br>imobilizado | Anticorpo a ser<br>removido | Solução de regeneração   | Volume de<br>injecção |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 1.7.2                    | 6.77.1                      | Ácido fosfórico 25 mM    | 5 µl                  |
|                          | 9.8.2                       | Ácido fosfórico 25 mM    | 5 µl                  |
|                          | 7.20.5                      | Ácido fosfórico 25 mM    | 5 µl                  |
|                          | 6.22.2                      | Ácido fosfórico 25 mM    | 5 µl                  |
|                          | 6.34.2                      | Hidróxido de sódio 25 mM | 5 µl                  |
|                          | 6.67.1                      | Hidróxido de sódio 25 mM | 5 µl                  |
| 6.22.2                   | 9.8.2                       | Hidróxido de sódio 25 mM | 20 µl                 |
|                          | 7.26.4                      | Hidróxido de sódio 25 mM | 5 µl                  |
| 6.34.2                   | 9.8.2                       | Hidróxido de sódio 25 mM | 70 µl                 |
|                          | 1.7.2                       | Hidróxido de sódio 40 mM | 5 µl                  |
|                          | 7.26.4                      | Hidróxido de sódio 40 mM | 5 µl                  |
| 6.67.1                   | 9.8.2                       | Hidróxido de sódio 40 mM | 5 µl                  |
|                          | 1.7.2                       | Hidróxido de sódio 40 mM | 5 µl                  |
| 7.20.5                   | 9.8.2                       | Ácido fosfórico 25 mM    | 5 µl                  |
|                          | 1.7.2                       | Ácido fosfórico 25 mM    | 5 µl                  |
|                          | 7.26.4                      | Ácido fosfórico 25 mM    | 5 µl                  |
| 7.26.4                   | 9.8.2                       | Hidróxido de sódio 40 mM | 20 µl                 |
|                          | 6.22.2                      | Ácido fosfórico 75 mM    | 20 µl                 |
|                          | 7.20.5                      | Ácido fosfórico 75 mM    | 20 µl                 |
|                          | 7.16.6                      | Ácido fosfórico 75 mM    | 20 µl                 |
| 9.8.2                    | 9.8.2                       | Ácido fosfórico 25 mM    | 15 µl                 |
|                          | 6.22.2                      | Ácido fosfórico 25 mM    | 10 µl                 |
|                          | 7.20.5                      | Ácido fosfórico 25 mM    | 20 µl                 |
|                          | 7.16.6                      | Ácido fosfórico 25 mM    | 10 µl                 |

(O fluxo foi de 50 µl/min durante todos os procedimentos de regeneração)

Após regeneração, a proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc foi novamente ligada e mais anticorpos a testar foram injectados. Estes procedimentos foram realizados ante todo o painel de clones ter sido injectado na superfície do

anticorpo imobilizado, com a proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub> Fc ligada. Uma nova célula de fluxo com um anticorpo diferente imobilizado e MAdCAM ligada foi então usada para testar os nove clones a testar. Era previsível que os anticorpos anti-MAdCAM 1.7.2 e 1.8.2 reconhecessem o mesmo epítipo MAdCAM, baseado na estreita homologia da sequência primária de aminoácidos das suas cadeias pesada e leve capa, SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8 respectivamente. Assim, apenas 1.7.2 foi avaliado na matriz de resposta BIAcore. Os anticorpos 6-14-2 e 6.73.2 foram omitidos desta análise, mas todas as outras combinações de pares de anticorpos anti-MAdCAM foram testadas desta forma. Um nível arbitrário de 100 RU foi escolhido como o patamar de ligação/não ligação e uma matriz de respostas, (Tabela 7), foi criada com base na ligação observada.

Tabela 7. Matriz de respostas com compartimentação de epítopos BIAcore

| Anticorpo imobilizado | Anticorpo secundário |        |        |        |        |       |       |        |        |
|-----------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|                       | 6.22.2               | 6.34.2 | 6.67.1 | 6.77.1 | 7.20.5 | 9.8.2 | 1.7.2 | 7.26.4 | 7.16.6 |
| 6.22.2                | -                    | -      | -      | -      | -      | X     | X     | X      | X      |
| 6.34.2                | -                    | -      | -      | -      | -      | X     | X     | X      | X      |
| 6.67.1                | -                    | -      | -      | -      | -      | X     | X     | -      | -      |
| 6.77.1                | -                    | -      | -      | -      | -      | X     | X     | -      | X      |
| 7.20.5                | -                    | -      | -      | -      | -      | X     | X     | X      | X      |
| 9.8.2                 | X                    | X      | X      | X      | X      | X     | -     | -      | X      |
| 1.7.2                 | X                    | X      | X      | X      | X      | X     | -     | -      | X      |
| 7.26.4                | X                    | X      | -      | -      | X      | X     | -     | -      | X      |
| 7.16.6                | X                    | X      | -      | -      | X      | -     | -     | -      | -      |

Matriz de resposta para todas as combinações de pares de anticorpos, - indica ausência de ligação do anticorpo sonda, x indica que foi observada ligação (acima de um patamar escolhido de 100 RU).

A diagonal da matriz na Tabela 7 (sombreado a cinzento) mostra os dados de ligação para pares de sondas idênticas. Em todos os casos, excepto para os dois clones 7.16.6 e 9.8.2, os anticorpos foram auto-bloqueadores. Os anticorpos 7.16.6 e 9.8.2 não competem de forma cruzada. A ausência de auto-bloqueio poderá ser devida a uma alteração conformacional induzida pelo mAb na proteína de fusão que permite a ligação adicional do mAb a um segundo local em MAdCAM-IgFc.

O agrupamento dos clones que mostra o mesmo padrão de reactividade dá origem a pelo menos seis compartimentos de epitopos diferentes, como se mostra na representação gráfica (Figura 5).

Mais identificação precisa das sequências dos epitopos de MAdCAM com as quais um anticorpo anti-MAdCAM interage pode ser determinada por qualquer um de uma série de métodos, incluindo análise Western ou arranjos de bibliotecas de péptidos aplicados como manchas (Reineke *et al.*, Curr. Topics in Microbiol. and Immunol 243: 23-36 (1999), M. Famulok, E-L Winnacker, C-H Wong eds., Springer-Verlag, Berlin), apresentação fágica ou bacteriana de bibliotecas de expressão flagelina/*fliC* ou simples análise MALDI-TOF de fragmentos proteicos ligados após proteólise limitada.

Ensaaios imuno-histoquímicos:

Amostras de tecidos congelados embebidos em OCT ou sucrose de íleo (placas de Peyer), nódulos linfáticos mesentéricos, baço, estômago, duodeno, jejuno e cólon foram usados como controlos de coloração positiva para os mAbs anti-MAdCAM. Para a coloração de secções humanas com mAbs IgG2 humanos, foram gerados derivados biotinilados dos mAbs anti-MAdCAM. Secções de 10 µm de tecido congelado foram cortadas com lâminas revestidas a poli L-lisina, colocadas directamente em 100% de acetona a 4°C (10 min), depois 3% de peróxido de hidrogénio em metanol (10 min), lavagem entre os passos com PBS. As lâminas foram bloqueadas com o Biotin Blocking System (DAKO Cat. No. X0590) antes da incubação com o anticorpo primário (1:100 - 1:1000) em PBS (1 hr), lavadas com PBS-Tween 20 (0,05%) e depois a ligação foi revelada com HRP-Estreptavidina Cat. N° 550946, 30 min) e o substrato DAB (Sigma Cat. N° D5905). Para os mAbs IgG<sub>4</sub>, foi usado um anticorpo secundário de murganho anti-IgG<sub>4</sub> humana conjugado com HRP (Zymed Cat. No. 3840). As lâminas foram contrastadas com Mayer's Haemalum (1 min), lavadas e depois montadas em DPX.

A afinidade de ligação foi comparada para uma série de espécies (murganho, rato, coelho, cão, tecido cinomolgo e tecido humano). Não foi observada reactividade cruzada dos anticorpos anti-MAdCAM para MAdCAM de murganho recombinante, quando analisados por ELISA. Os dados para tecido humano, cinomolgo e de cão estão apresentados na forma de tabela, Tabela 8 abaixo:

Tabela 8. Padrão de reatividade cruzada de anticorpos anti-MAdCAM contra ortólogos de espécie de MAdCAM

| CLONE         | Luminex BIN | Reatividade cruzada IHC |           |            |          |
|---------------|-------------|-------------------------|-----------|------------|----------|
|               |             | íleo humano             | íleo cino | íleo saqui | íleo cão |
| <b>1.7.2</b>  | <b>3a</b>   |                         |           |            |          |
| <b>1.8.2</b>  | <b>3a</b>   |                         |           |            |          |
| <b>7.16.6</b> | <b>3b</b>   |                         |           |            |          |
| <b>7.20.5</b> | <b>2b</b>   |                         |           | n.d        |          |
| <b>7.26.4</b> | <b>3b</b>   |                         |           | n.d        |          |
| <i>6.14.2</i> | <i>2</i>    |                         |           | n.d        |          |
| <i>6.22.2</i> | <i>2</i>    |                         |           | n.d        |          |
| <i>6.34.2</i> | <i>6</i>    |                         |           | n.d        |          |
| <i>6.67.1</i> | <i>5</i>    |                         |           | n.d        |          |
| <i>6.73.2</i> | <i>3</i>    |                         | n.d       | n.d        |          |
| <i>6.77.1</i> | <i>1</i>    |                         |           | n.d        |          |
| <b>9.8.2</b>  | <b>3a</b>   |                         | n.d       |            |          |

IgG2

IgG4

Sem ligação

ligação

n.d: não determinado

A ligação anti-MAdCAM a estruturas endoteliais especializadas e a tecido linfóide está indicada pelo sombreado, de acordo com a chave. A compartimentação de epitopos baseada na análise de epitopos por Luminex para os anticorpos anti-MAdCAM 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.3 e 6.77.1 (itálico) derivou de experiências separadas das realizadas para 1.7.2, 1.8.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 e 9.8.2 (negrito), conforme indicado pela diferença do tipo de caracter.

Todos os anticorpos anti-MAdCAM testados tinham a capacidade de reconhecer um epitopo de MAdCAM humano expresso nos compartimentos do endotélio vascular do trato gastrointestinal. Para além de 1.7.2 e de 1.8.2, todos os anticorpos anti-MAdCAM testados foram capazes de se ligarem especificamente aos compartimentos do endotélio vascular do trato gastrointestinal de cinomolgo. Outros anticorpos anti-MAdCAM, nomeadamente 6.14.2 e 6.67.1 também possuem a capacidade de reconhecer especificamente o ortólogo MAdCAM de cão assim como o MAdCAM de cinomolgo.

Geração de uma linha celular CHO que expressa MAdCAM quimérico, cinomolgo/humano, funcionalmente activo:

As diferenças na afinidade de ligação de certos anticorpos anti-MAdCAM para MAdCAM humano e cinomolgo, levou-nos a determinar se podia haver uma base estrutural para esta observação. [0239] Com base na sequência de aminoácidos publicada para MAdCAM de macaco (Shyjan AM, *et al.*, J Immunol., 156, 2851-7 (1996)), foram desenhadas sequências iniciadoras para amplificar por PCR a sequência do domínio de ligação de MAdCAM  $\alpha_4\beta_7$  cinomolgo. O RNA total foi preparado a partir de nódulo linfático mesentérico de cinomolgo removido e congelado (cerca de 200 mg) usando o método Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. 1-2  $\mu$ g foi iniciado com oligo-dT e sujeito a transcrição reversa com transcriptase reversa de AMV (Promega). Uma proporção do produto da transcrição reversa

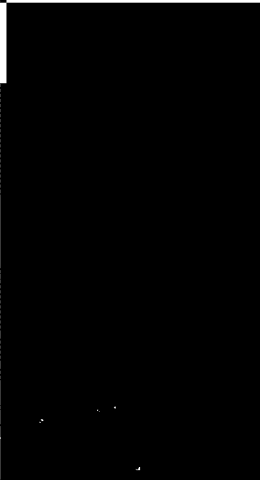
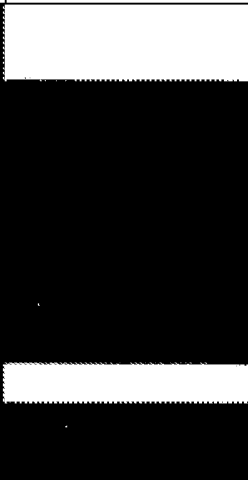
foi sujeito a PCR com as sequências iniciadoras directa 5'-AGC ATG GAT CGG GGC CTG GCC-3' (SEQ ID NO: 67) e reversa 5'-GTG CAG GAC CGG GAT GGC CTG-3' (SEQ ID NO: 68) com polimerase GC-2 em GC melt 1M (Clontech) e uma temperatura de emparelhamento de 62°C. Um produto de RT-PCR do tamanho adequado foi excisado e purificado a partir de um gel de 1% de agarose após electroforese, depois clonado em TOPO-TA (Invitrogen) entre os locais EcoRI de pCR2.1. O inserto foi confirmado por sequenciação. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos previstas estão apresentadas em SEQ ID NOS 49 e 50, respectivamente.

As sequências de aminoácidos de MAdCAM humano e cinomolgo previstas para todo o domínio de ligação  $\alpha_4\beta_7$  mostram um elevado grau de identidade de sequências (90.8%) quando alinhadas (Figura 3 proporciona este alinhamento de sequências). Para gerar uma linha celular que expresse MAdCAM cinomolgo funcionalmente activo, a qual simule o padrão de ligação anti-MAdCAM representado pela Tabela 8, um fragmento SacI correspondendo à sequência do domínio de ligação  $\alpha_4\beta_7$  cinomolgo em pCR2.1, foi subclonado directamente na construção de MAdCAM C-terminal humano pIND-Hygro contendo o pé de mucina C-terminal e o domínio transmembrar, atrás descrito. A sequência e a sua orientação foram verificadas, depois um fragmento KpnI/NotI foi clonado no vector pEF5FRTV5GWCAT (Invitrogen), substituindo a sequência codificadora de CAT e usada em transfecções para gerar

clones isolados de expressão estável em células Flp In CHO (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

A ligação dos clones de anticorpos anti-MAdCAM às células CHO que expressam quimeras de MAdCAM cinomolgo/humano foi avaliada por citometria de fluxo e a actividade funcional dos anticorpos anti-MAdCAM foi determinada usando um ensaio de adesão de células JY muito semelhante ao atrás descrito. A actividade de ligação e funcional de anticorpos anti-MAdCAM estão expressas na Tabela 9.

Tabela 9. Correlação entre a actividade funcional no ensaio de adesão MAdCAM cinomolgo/humano-CHO/JY e a ligação de células CHO MAdCAM cinomolgo/humano, conforme medido por FACS, para uma gama de anticorpos anti-MAdCAM.

| CLONE   | Functional<br>IC <sub>50</sub> (µg/mL) | Ligação FACS                                                                         |                                                                                       |  |
|---------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--|
|         |                                        | Humano                                                                               | Cino/humano                                                                           |  |
| 1.7.2   | Inativo                                |  |  |  |
| 1.8.2   | Inativo                                |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 7.16.6  | 0.72                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 7.20.5  | 0.62                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 7.26.4  | 0.96                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 6.14.2  | 0.53                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 6.22.2  | 0.83                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 6.34.2  | 0.47                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 6.67.1  | 0.75                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 6.73.2  | Inativo                                |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 6.77.1  | 0.64                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |
| 9.8.2   | 0.83                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |
| IgG2    |                                        | Sem ligação                                                                          |                                                                                       |  |
| IgG4 3% |                                        | ligação                                                                              |                                                                                       |  |



No conjunto, existe uma boa correlação entre a capacidade de um determinado anticorpo anti-MAdCAM se ligar a MAdCAM humano ou cinomolgo, conforme detectado por imunohistoquímica (Tabela 8), com ligação baseada em células recombinantes e actividade funcional (Tabela 9). Os anticorpos anti-MAdCAM 1.7.2, 1.8.2 e 6.73.2, por exemplo, demonstraram uma ausência consistente de ligação a tecidos cinomolgos e a células que expressam uma proteína MAdCAM quimérica cinomolgo/humano. Os anticorpos anti-MAdCAM 1.7.2, 1.8.2 e 6.73.2 também não têm a capacidade para detectar a actividade bloqueadora funcional no ensaio de adesão MAdCAM cinomolgo/humano/JY.

Abordagens semelhantes poderão ser usadas para definir o epitopo dos anticorpos anti-MAdCAM 6.14.2 e 6.67.1 que reconhecem MAdCAM de cão.

#### Exemplo IV:

Utilização de mAbs anti-MAdCAM na detecção de MAdCAM solúvel circulante como método de diagnóstico de doença

Os anticorpos anti-MAdCAM podem ser usados para a detecção de MAdCAM solúvel circulante (sMAdCAM). A detecção de sMAdCAM em amostras clínicas de plasma, soro ou outros fluidos, tais como fezes, urina, expectoração, mas não lhe

estando limitado, é provável que seja útil como biomarcador de doença para a doença subjacente, incluindo doença inflamatória intestinal, mas não lhe estando limitado.

Com base nos dados de compartimentação de epitópos (Tabelas 7 e 8), os anticorpos anti-MAdCAM 1.7.2 e 7.16.6 parecem reconhecer epitópos diferentes em MAdCAM humano. Placas de ELISA foram revestidas durante a noite a 4°C com 100 µl/alvéolo de uma solução a 50 µg/ml de 1.7.2 em soro fisiológico tamponado com fosfatos (PBS). Após incubação a placa foi bloqueada durante 1,5 horas com tampão de bloqueio de PBS contendo 10% de leite (200 µl/alvéolo). Após incubação a placa foi lavada com PBS (2 x 100 µl/alvéolo) e diluições seriadas da proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub>-Fc, de uma concentração máxima de 50 µg/ml até aproximadamente 5 ng/ml em PBS, para um volume final de 100 µl, foram adicionadas à placa para incubação durante 2 horas à temperatura ambiente. Numa abordagem semelhante, a proteína MAdCAM-IgG<sub>1</sub>-Fc pode ser diluída em plasma ou soro, ou noutro biofluido relevante e usado para determinar a expressão de MAdCAM solúvel numa amostra clínica, como descrito abaixo. Como controlo negativo, apenas tampão foi adicionado aos alvéolos contendo o anticorpo anti-MAdCAM primário. Após este tempo, a placa foi lavada com PBS (3 x 100 µl/alvéolo) e a placa foi então incubada no escuro com 7.16.6 marcado com Alexa488 (100 µl, 5 µg/ml). 7.16.6 marcado com Alexa488 foi gerado usando um kit comercial (Molecular Probes, A-20181), seguindo os protocolos do fabricante.

A placa foi lavada com PBS contendo 0,05% de Tween-20 e a ligação de 7.16.6 marcado a MAdCAM solúvel capturado foi determinada medindo a fluorescência Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Reader ( $\lambda$  de excitação 485 nm,  $\lambda$  de emissão 535 nm contagem a partir do topo, 8 mm a partir do topo, durante 0,1 seg com abertura de emissão normal). Quando a fluorescência é representada em função da concentração da proteína de fusão MAdCAM-IgG<sub>1</sub>-Fc, Figura 6, indica que 1.7.2 e 7.16.6 marcados podem ser usados para fins de diagnóstico para determinar o nível de MAdCAM solúvel circulante expresso numa amostra de biofluido ou clínica. Esta abordagem de ELISA tipo sanduíche não está restringida à utilização de 1.7.2 e 7.16.6, mas qualquer combinação de anticorpos anti-MAdCAM que reconhecem diferentes epitopos em MAdCAM, como descrito pelos dados e interpretação da Tabela 7 e da Figura 5. Estratégias semelhantes poderão ser aplicadas ao desenvolvimento de ensaios semelhantes, tais como imuno-histoquímica e transferência Western, com os outros anticorpos anti-MAdCAM descritos, usando diferentes parceiros, variantes, marcas, etc.

#### EXEMPLO V:

Estrutura de aminoácidos de mAbs anti-MAdCAM  
preparados de acordo com o invento

Na discussão que se segue, é proporcionada

informação estrutural relacionada com os mAbs preparados de acordo com o invento.

Para analisar estruturas de mAbs produzidos de acordo com o invento, clonamos os genes codificadores dos fragmentos das cadeias pesada e leve do clone de hibridoma específico. A clonagem do gene e sequenciação foram conseguidas como se segue:

mRNA poli(A)+ foi isolado a partir de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células de hibridoma derivadas de murinhos XenoMouse imunizados usando o kit Fast-Track (Invitrogen). A geração de cDNA iniciado aleatoriamente foi seguida de PCR. Para Sequências iniciadoras específicas da família de VH ou Vk humano (Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable gene and design of family-specific oligonucleotide probes"; Eur. J. Immunol., 21, 985-991 (1991)) ou uma sequência universal para VH humano, MG-30 (5'-CAG GTG CAG CTG GAG CAG TCI GG-3 (SEQ ID NO: 108) foi usado conjuntamente com sequências iniciadoras específicas para Cy2 humana, MG40-d (5-GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA-3 (SEQ ID NO: 109) ou região constante Cy4, MG-40d (5'GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA CTG T -3 (SEQ ID NO: 110), ou região constante Ck (hkp2; como anteriormente descrito em Green e tal., 1994). As sequências dos transcritos das cadeias pesada e capa derivadas de mAb humano derivadas

de hibridomas foram obtidas por sequenciação directa dos produtos de PCR gerados a partir de RNA poli (A+) usando as sequências iniciadoras atrás descrita. Os produtos de PCR foram clonados em pCR2.1 usando um kit de clonagem TOPO-TA (Invitrogen) e ambas as cadeias foram sequenciadas usando os kits de sequenciação com terminador corado Prism e um aparelho de sequenciação ABI 377. Todas as sequências foram analisadas através de alinhamentos com o "directório de sequências V BASE" (Tomlinson, *et al*, J. Mol. Biol., 227, 776-798 (1992); Hum. Mol. Genet., 3, 853-860 (1994); EMBO J., 14, 4628-4638 (1995).)

Ainda, cada um dos anticorpos, 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod, foram sujeitos a sequenciação do DNA completo. Para tal, RNA total foi isolado a partir de aproximadamente  $3-6 \times 10^6$  células de hibridoma usando um kit RNeasy (Qiagen). O mRNA foi sujeito a transcrição reversa usando oligo-dT e um sistema de transcriptase reversa baseada em AMV (Promega). Usou-se a V BASE para projectar sequências iniciadoras 5' específicas para amplificação, contendo uma sequência Kozak óptima e um codão de iniciação ATG (sublinhado) e sequências iniciadoras reversas 3' para as cadeias pesada e capa específicas como descrito na Tabela 10.

Tabela 10: Pares de sequências iniciadoras para PCR para amplificação de cDNA a partir de hibridomas que expressam o mAb anti-MAdCAM e sequências iniciadoras usadas na construção de versões modificadas de anticorpos anti-MAdCAM.

|          | Sequência oligonucleotídica                                                     |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------|
| VH1-18   | 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATCCTT 3'<br>(SEQ ID NO: 70)  |
| VH3-15   | 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATOGAGTTTGGGCTGAGCGGATT 3'<br>(SEQ ID NO: 71)   |
| VH3-21   | 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGCTAAGGGGCTCCGCTGGGTT 3'<br>(SEQ ID NO: 72)   |
| VH3-23   | 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTT 3'<br>(SEQ ID NO: 73)  |
| VH3-30   | 5' TATCTAAGTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTC GGCTGAGCTGGGTT 3'<br>(SEQ ID NO: 74)  |
| VH3-33   | 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTCGGTT 3'<br>(SEQ ID NO: 75)  |
| VH4-4    | 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCCACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTC 3'<br>(SEQ ID NO: 76) |
| A2/A3    | 5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGCGCCCTTCCATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTG 3'<br>(SEQ ID NO: 77) |
| A26      | 5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGTTGCCATCACAACCTCATTGGG 3'<br>(SEQ ID NO: 78) |
| B3       | 5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGTTTGCAGACCCAGGTCTT 3'<br>(SEQ ID NO: 79)    |
| O12      | 5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG 3'<br>(SEQ ID NO: 80)  |
| O18      | 5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAG 3'<br>(SEQ ID NO: 81)  |
| RevlgG2  | 5' TTCTCTGATCAGAATTCTATCATTTACCCGAGACAGGGAGAG 3'<br>(SEQ ID NO: 82)             |
| RevlgG4  | 5' TTCTTTGATCAGAATTCTCTACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC 3'<br>(SEQ ID NO: 83)           |
| RevKappa | 5' TTCTCTGATCGAGAATTCTATCATTTACCCAGAGACAGGGAGAG 3'<br>(SEQ ID NO: 84)           |

(continuação)

|                 | Sequência oligonucleotídica                                                           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 6.22.2vk_F1     | 5'-GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACC CTC ACC ATC AAT AGC CTG GAA GC-3' (SEQ ID NO: 85)      |
| 6.22.2VK_R1     | 5'-GCT TCC AGG CTA TTG ATG GTG AGG GTG AAA TCT GTC CCA GAT CC-3' (SEQ ID NO: 86)      |
| 6.22.2VH_F1     | 5'-GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC-3' (SEQ ID NO: 87)                             |
| 6.22.2VH_R1     | 5'-GCT ACT GAA GGT GAA TCC AGA CGC TGC-3' (SEQ ID NO: 88)                             |
| 6.22.2VH_CS*    | 5'-CGG AGG TGC TTC TAG AGC AGG GCG-3' (SEQ ID NO: 89)                                 |
| 6.34.2VK_F1     | 5'-GCA AGT CAG AGT ATT AGT AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CC-3' (SEQ ID NO: 90)  |
| 6.34.2VK_R1     | 5'-GGT TTC TGC TGA TAC CAA TTT AAA TAG CTA CTA ATA CTC TGA CTT GC-3' (SEQ ID NO: 91)  |
| 6.34.2VK_F2     | 5'-CCA TCA GTT CTC TGC AAC CTG AGG ATT TTG CAA CTT ACT ACT GTC ACC-3' (SEQ ID NO: 92) |
| 6.34.2VK_R3     | 5'-GGT GAC AGT AGT AAG TTG CAA AAT CCT CAG GTT GCA GAG AAC TGA TGG-3' (SEQ ID NO: 93) |
| 6.34.2VH_F16.34 | 5'-GCA AAT GAA CAG CCT GCG CGC TGA GGA CAC G-3' (SEQ ID NO: 94)                       |
| 2VH R1          | 5'-CGT GTC CTC AGC GCG CAG GCT GTT CAT TTG C-3' (SEQ ID NO: 95)                       |
| 6.67.1VK_F1     | 5'-CAA TAA GAA CTA CTT AGC TTG GTA CCA ACA GAA ACC AGG ACA GCC-3' (SEQ ID NO: 96)     |
| 6.67.1VK_R1     | 5'-GGC TGT CCT GGT TTC TGT TGG TAC CAA GCT AAG TAG TTC TTA TTG-3' (SEQ ID NO: 97)     |
| 6.67.1VH_F1     | 5'-CCC TCA GGG GTC GAG TCA CCA TGT CAG TAG ACA CGT CCA AGA ACC-3' (SEQ ID NO: 98)     |
| 6.67.1VH_R1     | 5'-GGT TCT TGG ACG TGT CTA CTG ACA TGG TGA CTC GAC CCC TGA GGG-3' (SEQ ID NO: 99)     |
| 6.67.1VH_CS*    | 5'-ATT CTA GAG CAG GGC GCC AGG-3' (SEQ ID NO: 100)                                    |

(continuação)

|             | Sequência oligonucleotídica                                                               |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6.77.1VK_F1 | 5'-CCA TCT CCT GCA AGT CTA GTC AGA GCC TCC-3'<br>(SEQ ID NO: 101)                         |
| 6.77.1VK_R1 | 5'-GGA GGC TCT GAC TAG ACT TGC AGG AGA TGG-3'<br>(SEQ ID NO: 102)                         |
| 6.77-IVK_F2 | 5'-GGT TTA TTA CTG CAT GCA AAG TAT ACA GCT TAT GTC CAG TTT<br>TGG CC- 3' (SEQ ID NO: 103) |
| 6.77.1VK_R2 | 5'-GGC CAA AAC TGG ACA TAA GCT GTA TAC TTT GCA TGC AGT AAT<br>AAA CC- 3' (SEQ ID NO: 104) |
| 7.26.4K_F1  | 5'-CCT GCA AGT CTA GTC AGA GCC TCC-3' (SEQ ID NO: 105)                                    |
| 7.26.4K_R1  | 5'-GGA GGC TCT GAC TAG ACT TGC AGG-3' (SEQ ID NO: 106)                                    |

Os pares de sequências iniciadoras foram usados para amplificar os cDNAs usando Expand High Fidelity Taq polymerase (Roche) e os produtos de PCR clonados em pCR2.1 TOPO-TA (Invitrogen) para subsequente sequenciação. Os clones com a sequência verificada para a cadeia pesada e leve capa foram então clonados nos vetores pEE6.1 e pEE12.1 (LONZA) usando os locais XbaI/EcoRI e HindIII/EcoRI, respectivamente.

#### Análise da utilização de genes

A Tabela 11 apresenta a utilização de genes da cadeia pesada e leve capa para cada hibridoma descrito no invento.



Tabela 11: Utilização de genes da cadeia pesada e leve capa

| CLONE  | Cadeia pesada |                |      | Cadeia leve capa |     |
|--------|---------------|----------------|------|------------------|-----|
|        | VH            | D              | JH   | Vκ               | Jκ  |
| 1.7.2  | VH3-15        | D6-19          | JH4b | A3               | JK5 |
| 1.8.2  | VH3-15        | D6-19          | JH4b | A3               | JK5 |
| 7.16.6 | VH1-18        | D6-6           | JH6b | A2               | JK1 |
| 7.20.5 | VH4-4         | D3-10          | JH6b | A3               | JK4 |
| 7.26.4 | VH1-18        | D6-6           | JH6b | A2               | JK1 |
| 6.14.2 | VH3-23        | D5-5           | JH4b | O12              | JK5 |
| 6.22.2 | VH3-33        | D5-12          | JH6b | A26              | JK4 |
| 6.34.2 | VH3-30        | D4-23          | JH6b | O12              | JK3 |
| 6.67.1 | VH4-4         | D3-10          | JH4b | B3               | JK4 |
| 6.73.2 | VH3-23        | D6-19          | JH6b | O12              | JK2 |
| 6.77.1 | VH3-21        | D6-19          | JH6b | A2               | JK2 |
| 9.8.2  | VH3-33        | D3-10 or D3-16 | JH4b | O18              | JK5 |

|      |
|------|
| IgG2 |
| IgG4 |

### Análise de sequências

Para melhor examinar a estrutura dos anticorpos, as sequências de aminoácidos previstas dos anticorpos foram obtidas a partir dos cDNAs obtidos dos clones.

Os números indentificadores das sequências (SEQ ID NOS 1-48 e 51-68 proporcionam as sequências nucleotídicas e de aminoácidos das cadeias pesada e leve capa dos anticorpos anti-MAdCAM 1.7.2 (SEQ ID NOS 1-4), 1.8.2 (SEQ ID NOS 5-8), 6.14.2 (SEQ ID NOS 9-12), 6.22.2 (SEQ ID NOS 13-16), 6.34.2 (SEQ ID NOS 17-20), 6.67.1 (SEQ ID NOS 21-24), 6.73.2 (SEQ ID NOS 25-28), 6.77.1 (SEQ ID NOS 29-32), 7.16.6 (SEQ ID NOS 33-36), 7.20.5 (SEQ ID NOS 37-40), 7.26.4 (SEQ ID NOS 41-44), 9.8.2 (SEQ ID NOS 45-48) e os

anticorpos anti-MAdCAM modificados 6.22.2-mod (SEQ ID NOS 51-54), 6.34.2-mod (SEQ ID NOS 55-58), 6.67.1-mod (SEQ ID NOS 59-62) e 6.77.1-mod (SEQ ID NOS 63-66) e 7.26.4-mod (SEQ ID NOS 41-42, 67-68). Para cada sequência de anticorpo anti-MAdCAM clonada, as sequências da sequência do péptido sinal (ou as bases codificadoras das mesmas) estão indicadas em letras minúsculas e sublinhadas.

As Figuras 1A-1J proporcionam alinhamentos de sequências entre as sequências de aminoácidos previstas para a cadeia pesada dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 e 9.8.2 e a sequência de aminoácidos dos respectivos genes germinais. As posições das sequências CDR1, CDR2 e CDR3 dos anticorpos estão sublinhadas, as diferenças entre a sequência expressa e a sequência germinal correspondente estão indicadas a negrito e onde existem adições na sequência expressa comparativamente com a da linha germinal estas estão indicadas como um (-) na sequência germinal.

As Figuras 1K-1T proporcionam alinhamentos de sequências entre as sequências de aminoácidos prevista para a cadeia leve capa dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 e 9.8.2 e a sequência de aminoácidos dos respectivos produtos de genes germinais. As posições das sequências CDR1, CDR2 e CDR3 dos anticorpos estão sublinhadas, as diferenças entre a sequência expressa e a sequência germinal correspondente estão indicadas a negrito e onde exis-

tem adições na sequência expressa comparativamente com a sequência germinal estas estão indicadas como um (-) na sequência germinal.

*Presença de modificação pós-tradução: glicosilação e desamidação:*

O efeito de algumas das alterações na sequência de anticorpos anti-MAdCAM expressa, comparativamente com a sequência derivada da linha germinal, é introduzir resíduos que potencialmente poderão ser alvo de N-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr) e/ou desamidação (Asn-Gly) (ver Tabela 12). As sequências de ácido nucleico codificadoras do domínio variável da cadeia leve capa dos anticorpos anti-MAdCAM 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.26.4 e 9.8.2, (SEQ ID NOS: 16, 20, 24, 28, 32, 44 e 48) e do domínio variável da cadeia pesada do anticorpo 6.14.2 (SEQ ID NO:10), prevê a presença de N-glicosilação. A presença desta modificação pós-tradução foi investigada usando a combinação de SDS-PAGE e coloração com and Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein (Molecular Probes) com os mAbs 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.26.4 e 9.8.2.

Resumidamente, aproximadamente 2 µg de anticorpo anti-MAdCAM reduzido foi aplicado num gel de 4-12% de SDS-poliacrilamida usando um tampão MOPS. Após electroforese, o gel foi fixado em 50% MeOH, 5% ácido acético e lavado em 3% de ácido acético. Quaisquer açúcares no gel foram então oxidados com ácido periódico e corados usando Pro-Q®

Emerald 488 Glycoprotein Stain Kit (Molecular Probes). Após um passo final de lavagem, a coloração da glicoproteína foi visualizada usando um varredor de fluorescência num comprimento de onda de 473 nm.

Após coloração da glicoproteína, o gel foi corado para as proteínas totais usando o corante de géis de proteínas SYPRO Ruby e analisado usando um varredor de fluorescência acertado para 473 nm. As cadeias leve capa dos anticorpos anti-MAdCAM 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.26.4 e 9.8.2 coraram todas positivamente relativamente à presença de glicosilação. Como confirmação adicional, o anticorpo anti-MAdCAM 7.26.4, foi sujeito a digestão triptica/quimotriptica, a análise LC-NM/MS confirmou a presença de um péptido triptico modificado e proporcionou confirmação adicional da glicosilação da cadeia leve capa.

Sequências específicas Asn-Gly nas regiões CDR1 dos anticorpos anti-MAdCAM, 1.7.2, 1.8.2, 6.22.2 e 7.20.5, tornaram estas regiões sensíveis à desamidação. A desamidação a pH neutro introduz uma carga negativa e pode também conduzir a  $\beta$ -isomerização, a qual poderá afectar as propriedades de um anticorpo. Para os anticorpos anti-MAdCAM 1.7.2, 1.8.2 e 7.20.5, a presença de resíduos Asn-isoaspartato foi avaliada por espectroscopia de massa após captura da cadeia lateral de isoaspartato com MeOH.

Resumidamente, para o anticorpo anti-MAdCAM

1.7.2, o estatuto do péptido tríptico/Asp-N SSQSLQSNNGYNYL (SEQID NO: 69) (1573.7 Da) foi seleccionado para monitorização por LC-MS/MS. O anticorpo anti-MAdCAM 1.7.2 foi reduzido em DTT 10 mM, alquilado em Na iodoacetato 5 mM e subsequentemente trocado o tampão para tampão de digestão com tripsina (Tris HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,6). O anticorpo foi então misturado com tripsina modificada grau de pureza para sequenciação (Promega) numa proporção de protease:proteína de 1:20. A proteína foi digerida em tripsina durante 15 horas a 30°C e os péptidos resultantes separados por HPLC usando C-18 RPC num sistema Ettan LC. O péptido contendo <sup>33</sup>Asn (4032 Da) foi colhido da coluna e diluído em tampão de digestão Asp-N (tampão fosfato de sódio 650 mM, pH 8,0). Adicionou-se então a endoproteínase Asp-N (Roche) numa proporção aproximada de péptido:enzima de 10:1.

Adicionou-se cloreto de acetilo (100 µl) a uma amostra de metanol (1 mL, -20°C), e a mistura foi aquecida à temperatura ambiente. A digestão tríptica+Asp-N foi seca num Speed-Vac e depois adicionou-se 5 µl de metanol/cloreto de acetilo (45 min, temperatura ambiente), depois secou-se novamente num Speed-Vac. O resíduo resultante foi reconstituído em 0,1% TFA e os péptidos analisados inicialmente num espectrómetro de massa Voyager-DE STR MALDI-TOF usando o método da preparação da amostra em camada fina de nitricelulose ou a purificação me fase inversa usando C18 Zip Tips (Millipore) seguido de mistura de gotas com matriz α-ciano. A mistura de péptidos metilados foi igualmente analisada usando LC-MS/MS num espectrómetro de massa Deca

XP Plus Ion Trpa como atrás. A eluição foi directamente canalizada para o Ion Trap MS e os péptidos foram subsequentemente analisados por MS e MS/MS. A MS foi regulada para analisar todos os iões entre 300 e 2000 Da. O ião mais forte em qualquer varrimento particular foi então sujeito a análise MS/MS.

Tabela 12: Modificação pós-tradução de anticorpos anti-MAdCAM

| clone  | Cadeia pesada                      |     | Cadeia leve cappa                  |         |                                |     |
|--------|------------------------------------|-----|------------------------------------|---------|--------------------------------|-----|
|        | Glicosilação<br>(NXS/T) confirmado |     | Glicosilação<br>(NXS/T) confirmado |         | Desamidação<br>(NS) confirmado |     |
| 1.7.2  | TPNNSAMT                           | N.D | CKSNQSLLY                          | MS/PAGE | LQSNQYN                        | MS  |
| 1.8.2  |                                    |     |                                    |         | LQSNQYN                        | MS  |
| 7.18.6 |                                    |     |                                    |         | HGNQYNY                        | MS  |
| 7.20.5 |                                    |     |                                    |         |                                |     |
| 7.26.4 |                                    |     |                                    |         |                                |     |
| 6.14.2 |                                    |     |                                    |         |                                |     |
| 6.22.2 |                                    |     | SGTNFTLTI                          | PAGE    | LTINGLEA                       | N.D |
| 6.34.2 |                                    |     | ASQNISSYL                          | PAGE    |                                |     |
| 6.67.1 |                                    |     | SSNNKTYLA                          | PAGE    |                                |     |
| 6.73.2 |                                    |     | RASQNTN                            | PAGE    |                                |     |
| 6.77.1 |                                    |     | SCNSSQSL                           | PAGE    |                                |     |
| 9.8.2  |                                    |     | HSDNLSIT                           | PAGE    |                                |     |

|      |
|------|
| IgG2 |
| IgG4 |

#### *Estudos de mutagénese:*

A sequência de aminoácidos primária dos anticorpos anti-MAdCAM exemplificados neste invento pode ser modificada, por mutagénese dirigida, para remover potenciais locais de modificação pós-tradução (e.g., glicosilação, desamidação) ou para alterar o fundo de isotipo ou

para fazer outras alterações que possam melhorar a utilidade terapêutica. Como exemplo, usou-se PCR para introduzir alterações nos anticorpos anti-MAdCAM6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 e 7.26.4, para reverter determinadas sequências estruturais para sequências germinais, para remover potenciais locais de glicosilação e/ou para alterar o fundo de isotipo para uma IgG<sub>2</sub> humana. Os cDNAs clonados em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng), correspondendo às sequências de nucleótidos da cadeia pesada SEQ ID NOS: 15, 19, 23, 31 e 43, foram usados como matriz numa série de PCRs usando sobreposição-extensão e um painel de séries de sequências iniciadoras descritos na Tabela 10.

Cadeia pesada 6.22.2: As séries de sequências iniciadoras para PCR6.22.2\_VH\_F1 e 6.22.2VH\_CS\* (1) e VH3-33 e 6.22.2\_VH\_R1(2) foram usadas para gerar produtos de PCR separados (1) e (2), usando uma polimerase Taq Expand e uma matriz de cDNA em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representada pela sequência de nucleótidos SEQ ID NO:13. Os produtos (1) e (2) foram purificados e combinados num terceiro passo de PCR (cerca de 50 ng cada) juntamente com as sequências iniciadoras VH3-33 e VK6.22.2\_CS\*, para gerar o domínio V da cadeia pesada 6.22.2 modificada. Esta versão modificada possui uma mutação His/Phe em FR1 e introduz um local de restrição XbaI para permitir a clonagem em grelha num vector derivado de pEE6.1, designado pEE6.1CH, o qual possui o correspondente domínio constante de IgG<sub>2</sub> humana. O fragmento de PCR final foi clonado no local XbaI de pEE6.1 CH, confirmado a orientação e verificada a sequência

completa do inserto. A sequência nucleotídica da cadeia pesada de 6.22.2 modificada está encontrada em SEQ ID NO:51 e a sequência de aminoácidos correspondente em SEQ ID NO:52. As alterações nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos comparativamente com as sequências parentais estão indicadas.

Cadeia leve capa 6.22.2: As séries de sequências iniciadoras de PCR 6.22.2\_VK\_F1 e revKappa (1) e A26 e 6.22.2\_VK\_R1 (2) foram usadas para gerar produtos de PCR separados (1) e (2), usando uma polimerase Taq Expand e uma matriz de cDNA em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representada pela sequência de nucleótidos SEQ ID NO:15. Os produtos (1) e (2) foram purificados e combinados num terceiro passo de PCR (cerca de 50 ng cada) juntamente com as sequências iniciadoras A26 e revKappa, para gerar o domínio V da cadeia leve capa 6.22.2 modificada. Esta versão modificada possui uma mutação Asn/Asp e Gly/Ser na sequência FR3. O fragmento de PCR resultante foi clonado em pEE12.1 usando os locais HindIII/EcoRI e verificada a sequência completa. A sequência nucleotídica da cadeia leve capa de 6.22.2 modificada está encontrada em SEQ ID NO:53 e a sequência de aminoácidos correspondente em SEQ ID NO:54. As alterações nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos comparativamente com as sequências parentais estão indicadas.

Cadeia pesada 6.34.2: As séries de sequências iniciadoras de PCR 6.34.2\_VH\_F1 e 6.22.2VH\_CS\* (1) e VH3-30 e 6.34.2\_VH\_R1 (2) foram usadas para gerar produtos de PCR



separados (1) e (2), usando uma polimerase Taq Expand e uma matriz de cDNA em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representada pela sequência de nucleótidos SEQ ID NO:17. Os produtos (1) e (2) foram purificados e combinados num terceiro passo de PCR (cerca de 50 ng cada) juntamente com as sequências iniciadoras VH3-30 e VK6.22.2\_CS\*, para gerar o domínio V da cadeia pesada 6.34.2 modificada. Esta versão modificada possui uma mutação Ser/Arg em FR3 e introduz um local de restrição XbaI para permitir a clonagem em grelha num vector derivado de pEE6.1, designado pEE6.1CH, o qual possui o correspondente domínio constante de IgG<sub>2</sub> humana. O fragmento de PCR final foi clonado no local XbaI de pEE6.1 CH, confirmado a orientação e verificada a sequência completa do inserto. A sequência nucleotídica da cadeia pesada de 6.34.2 modificada está encontrada em SEQ ID NO:55 e a sequência de aminoácidos correspondente em SEQ ID NO:56. As alterações nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos comparativamente com as sequências parentais estão indicadas.

Cadeia leve capa 6-34.2: As séries de sequências iniciadoras de PCR 012 e 6.34.2\_VK\_R1 (1), 6.34.2\_VK\_F1 e 6.34.2\_VK\_R2 (2), assim como 6.34.2\_VK\_F2 e revKappa (3) foram usadas para gerar produtos de PCR separados (1), (2) e (3) usando uma polimerase Taq Expand e uma matriz de cDNA em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representada pela sequência de nucleótidos SEQ ID NO:19. Os produtos (1), (2) e (3) foram purificados e (1) e (2) foram combinados num terceiro passo de PCR (cerca de 50 ng cada) juntamente com as sequências

iniciadoras 012 e 6.34.2\_VK\_R2, para gerar o produto de PCR (4). Os produtos de PCR (2) e (3) foram combinados num quarto passo de PCR (cerca de 50 ng cada), juntamente com 6.34.2\_VK\_F1 e revKappa, para gerar o produto de PCR (5). Os produtos de PCR (4) e (5) foram purificados e combinados (Ceca de 50 ng cada) com as sequências iniciadoras 012 e revKappa para gerar o domínio V da cadeia leve capa 6.34.2 modificada. Esta versão modificada possui uma mutação Ser/Arg em CDR1, uma mutação Phe/Tyr em FR2 e as mutações Arg-Thr/Ser-Ser, Asp/Glu e Ser/Tyr na sequência FR3. O produto de PCR resultante foi clonado em pEE12.1 usando os locais HindIII/EcoRI e verificada a sequência completa. A sequência nucleotídica da cadeia leve capa de 6.34.2 modificada está encontrada em SEQ ID NO:57 e a sequência de aminoácidos correspondente em SEQ ID NO:58. As alterações nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos comparativamente com as sequências parentais estão indicadas.

Cadeia pesada 6.67.1: As séries de sequências iniciadoras de PCR 6.67.1\_VH\_F1 e 6.67.1 VH\_CS\* (1) e VH4-4 e 6.67.1\_VH\_R1 (2) foram usadas para gerar produtos de PCR separados (1) e (2), usando uma polimerase Taq Expand e uma matriz de cDNA em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representada pela sequência de nucleótidos SEQ ID NO:21. Os produtos (1) e (2) foram purificados e combinados num terceiro passo de PCR (cerca de 50 ng cada) juntamente com as sequências iniciadoras VH4-4 e VK6.67.1\_CS\*, para gerar o domínio V da cadeia pesada 6.67.1 modificada. Esta versão modificada possui uma conversão Ile-Leu-Ala/Met-Ser-Val em FR3 e in-

troduz um local de restrição XbaI para permitir a clonagem em grelha num vector derivado de pEE6.1, designado pEE6.1CH, o qual possui o correspondente domínio constante de IgG<sub>2</sub> humana. O fragmento de PCR final foi clonado no local XbaI de pEE6.1 CH, confirmado a orientação e verificada a sequência completa do inserto. A sequência nucleotídica da cadeia pesada de 6.67.1 modificada está encontrada em SEQ ID NO:59 e a sequência de aminoácidos correspondente em SEQ ID NO:60. As alterações nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos comparativamente com as sequências parentais estão indicadas.

Cadeia leve capa 6.67.1: As sequências iniciadoras de PCR 6.67.1\_VK\_F1 e revKappa (1) e B3 e 6.67.1\_VK\_R1 (2) foram usadas para gerar os produtos de PCR separados (1) e (2), usando uma polimerase Taq Expand e uma matriz de cDNA em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representada pela sequência de nucleótidos SEQ ID NO:23. Os produtos (1) e (2) foram purificados e combinados num terceiro passo de PCR (cerca de 50 ng cada) juntamente com as sequências iniciadoras B3 e revKappa, para gerar o domínio V da cadeia leve capa 6.67.1 modificada. Esta versão modificada possui uma mutação Thr/Asn em CDR1 e uma mutação Arg/Gly em FR2. O produto de PCR resultante foi clonado em pEE12.1 usando os locais HindIII/EcoRI e verificada a sequência completa. A sequência nucleotídica da cadeia leve capa de 6.67.1 modificada está encontrada em SEQ ID NO:61 e a sequência de aminoácidos correspondente em SEQ ID NO:62. As alterações nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos comparativamente com as sequências parentais estão indicadas.

Cadeia pesada 6.77.1: As séries de sequências iniciadoras de PCR VH 3-21 e 6.22.2VH\_CS\* foram usadas para gerar um único produto de PCR, usando uma polimerase Taq Expand e uma matriz de cDNA em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representada pela sequência de nucleótidos SEQ ID NO:29. Os produtos foram digeridos com XbaI, purificados em gel e clonados no local XbaI de pEE6.1 CH, e confirmada a orientação. O inserto foi verificado por sequenciação total. A sequência nucleotídica da cadeia pesada de 6.77.1 modificada está encontrada em SEQ ID NO:63 e a sequência de aminoácidos correspondente em SEQ ID NO:64. As alterações nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos comparativamente com as sequências parentais estão indicadas.

Cadeia leve capa 6.77.1: As sequências iniciadoras de PCR 6.67.1\_VK\_F1 e revKappa (1) e 6.77.1\_VK\_VK\_F1 e 6.77.1\_R2 (2), assim como 6.77.1\_VK\_F2 e revKappa (3) foram usadas para gerar produtos de PCR separados (1), (2) e (3), usando usando uma polimerase Taq Expand e uma matriz de cDNA em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representada pela sequência de nucleótidos SEQ ID NO:31. Os produtos (1), (2) e (3) foram purificados e (1) e (2) foram combinados num terceiro passo de PCR (cerca de 50 ng cada) juntamente com as sequências iniciadoras A2 e 6.77.1\_VK\_R2, para gerar o produto de PCR (4). Os produtos de PCR (2) e (3) foram combinados num quarto passo de PCR (cerca de 50 ng cada), juntamente com 6.77.1\_VK\_F1 e revKappa, para gerar o produto de PCR (5). Os produtos de PCR (4) e (5) foram

purificados e combinados (Ceca de 50 ng cada) com as sequências iniciadoras 012 e revKappa para gerar o domínio V da cadeia leve capa 6.77.1 modificada. Esta versão modificada possui uma mutação Asn/Lys em CDR1, uma mutação Ser/Tyr em FR2 e uma alteração de resíduo Cys/Ser na sequência CDR3. O produto de PCR resultante foi clonado em pEE12.1 usando os locais HindIII/EcoRI e verificada a sequência completa. A sequência nucleotídica da cadeia leve capa de 6.77.1 modificada está encontrada em SEQ ID NO:65 e a sequência de aminoácidos correspondente em SEQ ID NO:66. As alterações nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos comparativamente com as sequências parentais estão indicadas.

Cadeia leve capa 7.26.4: As sequências iniciadoras de PCR 7.26.4\_VK\_F1 e revKappa (1) e A2 e 7.26.4\_VK\_R1 (2) foram usadas para gerar os produtos de PCR separados (1) e (2), usando uma polimerase Taq Expand e uma matriz de cDNA em pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representada pela sequência de nucleótidos SEQ ID NO:43. Os produtos (1) e (2) foram purificados e combinados num terceiro passo de PCR (cerca de 50 ng cada) juntamente com as sequências iniciadoras A2 e revKappa, para gerar o domínio V da cadeia leve capa 7.26.4 modificada. Esta versão modificada possui uma mutação Asn/Ser em CDR1. O produto de PCR resultante foi clonado em pEE12.1 usando os locais HindIII/EcoRI e verificada a sequência completa. A sequência nucleotídica da cadeia leve capa de 7.26.4 modificada está encontrada em

SEQ ID NO:67 e a sequência de aminoácidos correspondente em SEQ ID NO:68. As alterações nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos comparativamente com as sequências parentais estão indicadas.

Um vector de expressão eucariótico funcional para cada uma das versões modificadas de 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 e 7.26.4, referidos como 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod, e representando respectivamente as sequências de nucleótidos da cadeia pesada SEQ ID NOS: 51, 55, 59, 63 e 41, e as correspondentes sequências de aminoácidos SEQ ID NOS: 52, 56, 60, 64 e 42, assim como as sequências de nucleótidos da cadeia leve capa SEQ ID NOS: 53, 57, 61, 65 e 67, e as correspondentes sequências de aminoácidos SEQ ID NOS: 54, 58, 62, 66 e 68 foram montadas como se segue: os insertos de cDNA da cadeia pesada correspondente a 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod e 6.77.1-mod foram excisados do vector pEE6.1 CH com NotI/SalI, a versão parental das cadeias pesadas de 7.26.4 foi removida do vector pEE6.1 com NotI/SalI e os fragmentos purificados foram clonados em locais idênticos no correspondente vector pEE12.1 contendo as versões modificadas das sequências das cadeias leves capa 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod. As sequências dos vectores foram confirmadas e as quantidades purificadas usadas em transfecções transitórias com células HEK 293T. Resumidamente,  $9 \times 10^6$  células HEK 293T, semeadas num frasco T165 no dia antes da transfecção e lavadas com

Optimem, foram transfectadas transitoriamente com cDNAs em vectores correspondendo a 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod (40 µg) usando Lipofectamine PLUS (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas durante 3 hrs, depois o meio de transfecção foi substituído com meio DMEM (Invitrogen 21969-035) contendo 10% de soro fetal de vitela com um teor ultra-baixo de IgG (Invitrogen 16250-078) e L-glutamina (50 ml). O meio sobrenadante foi colhido 5 dias mais tarde, esterilizado por filtração e o anticorpo anti-MAdCAM purificado usando cromatografia de afinidade em proteína G Sepharose, de forma semelhante ao descrito atrás. A quantidade de anticorpo recuperado (20-100 µg) foi quantificada por um ensaio de Bradford.

A actividade de anti-MAdCAM do anticorpo purificado por afinidade correspondente a 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod foi avaliada no ensaio da fusão MAdCAM-IgG1-Fc como anteriormente descrito. Os valores de IC<sub>50</sub> destes anticorpos anti-MAdCAM comparados com os anticorpos anti-MAdCAM parentais dos quais derivam estão apresentados na Tabela 13. Houve um efeito mínimo das substituições de aminoácidos descritas atrás na actividade dos anticorpos anti-MAdCAM modificados comparativamente com os anticorpos parentais. Os anticorpos também mantiveram a sua ligação a células CHO expressando MAdCAM humana recombinante ou a químera MAdCAM cinomolgo/humano.

Tabela 13. Actividade das versões modificadas dos anticorpos anti-MAdCAM, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod comparativamente com a dos anticorpos parentais

| Clone  | Ensaio da fusão MAdCAM IgG1 Fc |            |
|--------|--------------------------------|------------|
|        | Média de IC50 (µg/ml)          |            |
|        | Parental                       | Modificado |
| 6.22.2 | 0,018                          | 0,058      |
| 6.34.2 | 0,013                          | 0,049      |
| 6.67.1 | 0,013                          | 0,037      |
| 6.77.1 | 0,022                          | 0,077      |
| 7.26.4 | 0,021                          | 0,033      |

#### EXEMPLO VI

##### Aumento nos linfócitos B<sub>7</sub><sup>+</sup> na circulação periférica através do bloqueio de anticorpos anti-MAdCAM

Foi desenvolvido um ensaio para identificar e correlacionar um efeito mecanístico de um anticorpo anti-MAdCAM e do seu nível de circulação no sangue. Um anticorpo inibidor anti-MAdCAM deverá ter o efeito de inibição do recrutamento de leucócitos que expressam a integrina  $\alpha_4\beta_7$  para o trato gastrointestinal. As classes de leucócitos portadores de integrinas  $\alpha_4\beta_7$  deverão assim estar restringidas à circulação periférica.

Isto foi demonstrado com um mAb 7.16.6 totalmente humano, anti-MAdCAM humano, em cinomolgo.



O mAb 7.16.6 anti-MAdCAM humano (1 mg/kg) ou veículo (Na acetato 20 mM, 0,2 mg/ml de polissorbato, 80,45 mg/ml de manitol e 0,02 mg/ml de EDTA a pH 5,5) foram avaliados de forma semelhante por administração intravenosa via veia safena a dois grupos de macacos cinomolgos (n=4/grupo). No dia 3 pós-dosagem, colheram-se amostras de sangue em tubos com EDTA através de venipunctura femoral. Os anticorpos específicos de LPAM, os quais reagem de forma cruzada com a integrina  $\alpha_4\beta_7$  de cinomolgo, não são comercializados, assim foi usado um anticorpo anti- $\beta_7$  (que reconhece as integrinas  $\alpha_4\beta_7$  e  $\alpha_E\beta_7$ ). Os anticorpos (30  $\mu$ l), de acordo com a tabela que se segue, tabela 15, foram adicionados a tubos contendo 100  $\mu$ l de sangue de cinomolgo, misturado por agitação suave com vortex e incubados durante 20-30 mins a 4°C.

Tabela 15. Anticorpos (PB Pharmingen) usados na imunofenotipagem de sangue cinomolgo

| Número de catálogo | Anticorpo ou isotipo |
|--------------------|----------------------|
| 555748             | mIgG1, k-FITC        |
| 555844             | mIgG2a, k-PE         |
| 559425             | mIgG1-PerCP          |
| 555751             | mIgG1, k-APC         |
| 555728             | CD 28-FITC           |
| 555945             | $\beta_7$ -PE        |
| 558814             | CD 95-APC            |
| 550631             | CD4-PerCP            |

A cada um dos tubos, adicionou-se 1 ml de uma solução de lise 1:10 FACS (BD#349202), misturou-se com vortex suave e incubou-se à temperatura ambiente durante aproximadamente 12 minutos no escuro até estar completa a lise dos eritrócitos. Em seguida, adicionou-se a cada tubo 2 ml de tampão de coloração BD (#554656), misturou-se e centrifugou-se a 250 xg durante 6-7 mins à temperatura ambiente. O sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspenso em 3 ml de tampão de coloração, misturado de novo e centrifugado a 250 xg durante 6-7 mins à temperatura ambiente. O tampão Cytofix (BD#554655), contendo paraformaldeído (100 µl) foi adicionado aos sedimentos de células de sangue periférico de macaco e bem misturado com vortex a velocidade média/moderada. As amostras foram mantidas a 4°C no escuro até serem usadas no FACSCalibur. Imediatamente antes da aquisição, adicionou-se PBS (100 µl) a todos os tubos. Os números absolutos de células  $CD4^+ \beta_7^+ CD95^{lo} CD28^+$  (naive),  $CD4^+ \beta_7^+ CD95^{hi} CD28^+$  (memória central),  $CD4^+ \beta_7^- CD95^{hi} CD28^+$  (memória central),  $CD4^+ \beta_7^+ CD95^{hi} CD28^-$  (memória efectora) foram adquiridos através de separação adequada e análise de quadrantes. Outras subséries de células T. por exemplo células de memória T  $CD8^+$  ( $P_7^+ CD8^+ CD28^+ CD95^+$ ) e quaisquer outros leucócitos portadores de um ligando MAdCAM, podem também ser analisados por este método com os anticorpos adequados. Comparativamente com o controle veículo, o mAb anti-MAdCAM 7.16.6 causou um aumento de aproximadamente 3 vezes nos níveis de células T de memória centrais  $CD4^+ \beta_7^+ CD95^{hi} CD28^+$ , como se mostra na Figura 7. Não

houve efeitos na população de células T centrais de memória  $CD4^+\beta_7^-CD95^hiCD28^+$  circulantes, indicando que o efeito do mAb anti-MAdCAM 7.16.6 é específico das células T alojadas no intestino. Os efeitos do mAb anti-MAdCAM 7.16.6 nas populações de linfócitos  $(\alpha_4)\beta_7^+$  de cinonologo indicam que este é uma prova robusta do mecanismo do biomarcador, particularmente no contexto da aplicação prática num estabelecimento clínico.

### Sequências

SEQ ID NO: 1-48 e 51-68 proporcionam sequências de nucleótidos e de aminoácidos das cadeias pesadas e leves capa de doze anticorpos anti-MAdCAM humano, sequências de nucleótidos e de aminoácidos das sequências dos domínios de ligação cinomolgos MAdCAM  $\alpha_4\beta_7$  e sequências de nucleótidos e de aminoácidos de cinco anticorpos anti-MAdCAM humano modificados.

SEQ ID NO: 1-48 proporcionam as sequências de nucleótidos e de aminoácidos das cadeias pesadas e leves capa de doze anticorpos monoclonais humanos anti-MAdCAM: 1.7.2 (SEQ ID NO: 1-4), 1.8.2 (SEQ ID NO: 5-8), 6.14.2 (SEQ ID NO: 9-12), 6.22.2 (SEQ ID NO: 13-16), 6.34.2 (SEQ ID NO: 17-20), 6.67.1 (SEQ ID NO: 21-24), 6.73.2 (SEQ ID NO: 25-28), 6.77.1 (SEQ ID NO: 29-32), 7.16.6 (SEQ ID NO: 33-36), 7.20.5 (SEQ ID NO: 37-40), 7.26.4 (SEQ ID NO: 41-44), e 9.8.2 (SEQ ID NO: 45-48).

SEQ ID NO: 49-50 proporcionam sequências de nucleótidos e de aminoácidos das sequências de um domínio de ligação a MAdCAM  $\alpha_4\beta_7$  de cinomolgo.

SEQ ID NO: 51-68 proporcionam as sequências de nucleótidos e de aminoácidos dos anticorpos monoclonais anti-MAdCAM humano modificados: 6.22.2 modificado (SEQ ID NO: 51-54), 6.34.2 modificado (SEQ ID NO: 55-58), 6.67.1 modificado (SEQ ID NO: 59-62), 6.77.1 modificado (SEQ ID NO: 63-66) e as sequências de nucleótidos e de aminoácidos da cadeia leve capa do anticorpo monoclonal anti-MAdCAM modificado: 7.26.4 modificado (SEQ ID NO: 67-68). SEQ ID NOS: 70-106 e 108-110 proporcionam várias sequências iniciadoras. O presente invento descreve:

E1. Um anticorpo monoclonal humano ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à Molécula Mucosal Adressina de Adesão Celular ("Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule", MAdCAM).

E2. O anticorpo monoclonal humano ou porção de ligação ao antígeno do mesmo de acordo com E1, em que o referido anticorpo ou porção do mesmo possui pelo menos uma das seguintes propriedades:

- (a) Liga-se a células humanas;
- (b) Possui selectividade para MAdCAM relativamente a VCAM ou fibronectina de pelo menos 100 vezes;
- (c) liga-se a MAdCAM humano com um  $K_d$  de  $3 \times 10^{-10}$  M ou inferior; ou

(d) inibe a ligação de células que expressam  $\alpha_4\beta_7$  a MAdCAM humano;

(e) inibe o recrutamento de linfócitos para o tecido linfóide gastrointestinal.

E3. O anticorpo monoclonal humano ou porção de ligação ao antigénio de acordo com E2, em que o referido anticorpo ou porção se liga a MAdCAM humano com um  $K_d$  de  $3 \times 10^{-10}$  M ou inferior e inibe a ligação de células que expressam  $\alpha_4\beta_7$  a MAdCAM humano.

E4. Uma linha celular de hibridoma que produz o anticorpo monoclonal humano de acordo com E1, em que o hibridoma é seleccionado do grupo consistindo em 1.7.2 (ECACC Accession No. 03090901), 1.8.2 (ECACC Accession No. 03090902), 6.14.2 (ECACC No. de Acesso 03090903), 6.22.2 (ECACC No. de Acesso 03090904), 6.34.2 (ECACC No. de Acesso 03090905), 6.67.1 (ECACC No. de Acesso 03090906), 6.73.2 (ECACC No. de Acesso 03090907), 6.77.1 (BCACC No. de Acesso 03090908), 7.16.6 (ECACC No. de Acesso 03090909), 7.20.5 (ECACC No. de Acesso 03090910), 7.26.4 (ECACC No. de Acesso 03090911), e 9.8.2 (ECACC No. de Acesso 03090912).

E5. O anticorpo monoclonal humano produzid pela linha celular de hibridoma de acordo com E4 ou uma porção de ligação ao antigénio do referido anticorpo monoclonal.

E6. O anticorpo monoclonal humano de acordo com E5, em que é clivada a lisina C-terminal da cadeia pesada.

E7. O anticorpo monoclonal humano ou sua porção de ligação ao antígeno de acordo com E1 ou 5, em que o referido anticorpo ou porção de ligação ao antígeno inibe a ligação de MAdCAM a  $\alpha_4\beta_7$ , e em que o anticorpo ou porção do mesmo possui uma das seguintes características:

(a) compete de forma cruzada com um anticorpo de referência para a ligação a MAdCAM;

(b) Compete com um anticorpo de referência para a ligação a MAdCAM;

(c) liga-se ao mesmo epítipo de MAdCAM que um anticorpo de referência;

(d) liga-se a MAdCAM com substancialmente o mesmo  $K_d$  de um anticorpo de referência;

(e) liga-se a MAdCAM com substancialmente a mesma velocidade de dissociação de um anticorpo de referência;

em que o anticorpo de referência é seleccionado do grupo consistindo em: anticorpo monoclonal 1.7.2, anticorpo monoclonal 1.8.2, anticorpo monoclonal 6.14.2, anticorpo monoclonal 6.22.2, anticorpo monoclonal 6.34.2, anticorpo monoclonal 6.67.1, anticorpo monoclonal 6.73.2, anticorpo monoclonal 6.77.1, anticorpo monoclonal 7.16.6, anticorpo monoclonal 7.20.5, anticorpo monoclonal 7.26.4, anticorpo monoclonal 9.8.2, anticorpo monoclonal 6.22.2-mod, anticorpo monoclonal 6.34.2-mod, anticorpo monoclonal 6.67.1-mod, anticorpo monoclonal 6.77.1-mod e anticorpo monoclonal 7.26.4-mod.

E8. Um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a MAdCAM, em que o anticorpo é seleccionado do grupo consistindo em:

(a) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4, sem as sequências sinal;

(b) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:8, sem as sequências sinal;

(c) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:12, sem as sequências sinal;

(d) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:16, sem as sequências sinal;

(e) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:20, sem as sequências sinal;

(f) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:24, sem as sequências sinal;

(g) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:26 e SEQ ID NO:28, sem as sequências sinal;

(h) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:30 e SEQ ID NO:32, sem as sequências sinal;

(i) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:34 e SEQ ID NO:36, sem as sequências sinal;

(j) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:38 e SEQ ID NO:40, sem as sequências sinal;

(k) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:42 e SEQ ID NO:44, sem as sequências sinal;

(l) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:46 e SEQ ID NO:48, sem as sequências sinal;

(m) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:52 e SEQ ID NO:54, sem as sequências sinal;

(n) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:56 e SEQ ID NO:58, sem as sequências sinal;

(o) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:60 e SEQ ID NO:62, sem as sequências sinal;

(p) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:64 e SEQ ID NO:66, sem as sequências sinal;

(q) um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NO:42 e SEQ ID NO:68, sem as sequências sinal.

E9. Um anticorpo monoclonal ou uma porção de



ligação ao antígeno do mesmo, em que a cadeia pesada do referido anticorpo ou porção do mesmo compreende as CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada ou em que a cadeia leve compreende as CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo consistindo em: .7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod.

E10. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E9, em que o referido anticorpo ou porção do mesmo compreende uma cadeia pesada que utiliza um gene VH 1-18 humano, um gene VH 3-15 humano, um gene VH 3-21 humano, um gene VH 3-23 humano, um gene VH 3-30 humano, um gene VH 3-33 humano ou um gene VH 4-44 humano.

E11. O anticorpo monoclonal ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo de acordo com E10, em que o referido anticorpo ou porção compreende uma cadeia leve que utiliza um gene V<sub>K</sub> A2 humano, um gene V<sub>K</sub> A3 humano, um gene V<sub>K</sub> A26 humano, um gene V<sub>K</sub> B3 humano, um gene V<sub>K</sub> O12 humano ou um gene V<sub>K</sub> O18 humano.

E12. O anticorpo monoclonal humano ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E1, em que a região variável da cadeia pesada, a região variável da cadeia leve ou ambas são pelo menos 90% idênticas à sequência de aminoácidos da região ou regiões correspondentes de um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo consistindo em:

anticorpo monoclonal 1.7.2, anticorpo monoclonal 1.8.2, anticorpo monoclonal 6.14.2, anticorpo monoclonal 6.22.2, anticorpo monoclonal 6.34.2, anticorpo monoclonal 6.67.1, anticorpo monoclonal 6.73.2, anticorpo monoclonal 6.77.1, anticorpo monoclonal 7.16.6, anticorpo monoclonal 7.20.5, anticorpo monoclonal 7.26.4, anticorpo monoclonal 9.8.2, anticorpo monoclonal 6.22.2-mod, anticorpo monoclonal 6.34.2-mod, anticorpo monoclonal 6.67.1-mod, anticorpo monoclonal 6.77.1-mod e anticorpo monoclonal 7.26.4-mod.

E13. Um anticorpo monoclonal ou uma porção de ligação ao antigénio do mesmo que se liga especificamente a MAdCAM, em que:

(a) a cadeia pesada compreende as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de um anticorpo de referência seleccionado do grupo consistindo em: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod

(b) a cadeia leve compreende as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de um anticorpo de referência seleccionado do grupo consistindo em: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod

(c) o anticorpo compreende uma cadeia pesada de (a) e uma cadeia leve de (b); e

(d) o anticorpo de (c) em que as sequências de aminoácidos das CDRs da cadeia pesada e leve são seleccionadas do mesmo anticorpo de referência.

E14. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E13, em que a cadeia pesada, a cadeia leve ou ambas compreendem a sequência de aminoácidos que vai do começo da CDR1 até ao final da CDR3 da cadeia pesada, da cadeia leve ou de ambas, respectivamente, do anticorpo de referência.

E15. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com E13, em que o referido anticorpo compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada de um anticorpo seleccionado do grupo consistindo em: 1.7.2 (SEQ ID NO: 2); 1.8.2 (SEQ ID NO: 6); 6.14.2 (SEQ ID NO: 10); 6.22.2 (SEQ ID NO: 14); 6.34.2 (SEQ ID NO: 18); 6.67.1 (SEQ ID NO: 22); 6.73.2 (SEQ ID NO: 26); 6.77.1 (SEQ ID NO: 30); 7.16.6 (SEQ ID NO: 34); 7.20.5 (SEQ ID NO: 38); 7.26.4 (SEQ ID NO: 42); and 9.8.2 (SEQ ID NO: 46); 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 52); 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 56); 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 60); 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 64); e 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 42);

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de um anticorpo seleccionado do grupo consistindo em: 1.7.2 (SEQ ID NO: 4); 1.8.2 (SEQ ID NO: 8); 6.14.2 (SEQ ID NO: 12); 6.22.2 (SEQ ID NO: 16); 6.34.2 (SEQ ID NO: 20); 6.67.1 (SEQ ID NO: 24); 6.73.2 (SEQ ID NO: 28); 6.77.1 (SEQ ID NO: 32); 7.16.6 (SEQ ID NO: 36); 7.20.5 (SEQ ID NO: 40); 7.26.4 (SEQ

ID NO: 44); and 9.8.2 (SEQ ID NO: 48); 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 54); 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 58); 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 62); 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 66); e 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 68); ou

(c) a cadeia pesada de (a) e a cadeia leve de (b).

E16. O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma de E1-3 e 5-15 que é uma molécula de imunoglobulina G (IgG), IgM, IgE e IgA ou IgD, um anticorpo humanizado ou um anticorpo biespecífico.

E17. A porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma de E1-3, 5-7 e 9-16 que é um fragmento Fab, um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento Fv ou um anticorpo de cadeia simples.

E18. Uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma de E1-3 e 5-17 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

E19. Um método de tratamento de doença inflamatória num indivíduo necessitado, compreendendo o passo de administração ao referido indivíduo do anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das E1-3 e 5-17 em que o referido anticorpo ou porção de ligação ao antígeno inibe a ligação de MAdCAM a  $\alpha_4\beta_7$ .

E20. O método de E19, em que a doença inflamatória é doença inflamatória do trato gastrointestinal.

E21. O método de E20, em que a doença inflamatória do trato gastrointestinal é seleccionada do grupo consistindo em doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença diverticular, gastrite, doença hepática, esclerose biliar primária e colangite esclerosante.

E22. O método de E20, em que a doença inflamatória intestinal é doença de Crohn, colite ulcerativa ou ambas.

E23. O método de E20, em que as doenças inflamatórias intestinais são diabetes dependente de insulina e doença de enxerto versus hospedeiro.

E24. Uma linha celular isolada que produz o anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma de E1-3 e 5-17 ou a cadeia pesada ou a cadeia leve do referido anticorpo ou da referida porção do mesmo.

E25. A linha celular de acordo com E4 ou 24 que produz um anticorpo seleccionado do grupo consistindo em: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 e 9.8.2, ou um anticorpo

compreendendo as sequências de aminoácidos de um dos referidos anticorpos.

E26. A linha celular de acordo com E25 que produz um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo que consiste em: 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod ou um anticorpo compreendendo as sequências de aminoácidos dos referidos anticorpos.

E27. Uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação ao antigénio da mesma ou a cadeia leve ou uma porção de ligação ao antigénio da mesma de um anticorpo de acordo com qualquer uma de E1-3 e 5-17.

E28. Um vector compreendendo a molécula de ácido nucleico de acordo com E27, em que o vector facultativamente compreende uma sequência de controlo da expressão operacionalmente ligada à molécula de ácido nucleico.

E29. Uma célula hospedeira compreendendo o vector de acordo com E28 ou a molécula de ácido nucleico de acordo com E27.

E30. Uma célula hospedeira de acordo com E29 compreendendo uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia pesada ou de uma porção de ligação ao antigénio da mesma e uma molécula de ácido nucleico codificadora da

cadeia leve ou de uma porção de ligação ao antígeno da mesma de um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma de E1-3 e 5-17.

E31. Um método para a produção de um anticorpo monoclonal humano ou de uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga a MAdCAM, compreendendo a cultura da célula hospedeira de acordo com E29 ou 30 ou a linha celular de acordo com E4 ou 24 em condições adequadas e recuperação do referido anticorpo ou porção de ligação ao antígeno.

E32. Um animal transgênico não humano ou planta transgênica compreendendo (a) uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia pesada ou e uma porção de ligação ao antígeno da mesma; (b) uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia leve ou de uma porção de ligação ao antígeno da mesma; ou (c) ambas (a) e (b) de um anticorpo de acordo com qualquer uma de E 1-3 ou 5-17, em que o animal transgênico não humano ou planta transgênica expressa a referida cadeia pesada ou cadeia leve ou ambas.

E33. Um método de isolamento de um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a MAdCAM, compreendendo o passo de isolamento do anticorpo a partir do animal transgênico não humano ou planta transgênica de acordo com E32.

E34. Um método de tratamento de um indivíduo

necessitado com um anticorpo humano ou porção de ligação ao antigénio do mesmo que se liga especificamente a MAdCAM e inibe a ligação a  $\alpha_4\beta_7$ , compreendendo os passos de:

(a) administração de uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucleico isolado codificadora da cadeia pesada ou de uma porção de ligação ao antigénio da mesma, uma molécula de ácido nucleico isolada codificadora da cadeia leve ou de uma porção de ligação ao antigénio da mesma ou moléculas de ácido nucleico codificadoras da cadeia leve e da cadeia pesada ou porção de ligação ao antigénio das mesmas; e

(b) e expressão da molécula de ácido nucleico.

E35. Um método para a produção de um anticorpo monoclonal humano que se liga especificamente a MAdCAM, compreendendo os passos de:

(a) imunização de um animal transgénico não humano que é capaz de produzir anticorpos humanos com MAdCAM, com uma porção imunogénica de MAdCAM ou com uma célula ou tecido que expresse MAdCAM; e

(b) permitir que o animal transgénico monte uma resposta imune contra MAdCAM.

E36. Um anticorpo monoclonal humano produzido pelo método de acordo com E35.

E37. Um método de inibição da ligação de  $\alpha_4\beta_7$  a células que expressem MAdCAM humano compreendendo o contacto das células com o anticorpo monoclonal de acordo com



qualquer uma de E1-3 e 5-17 ou uma porção de ligação ao antigénio do mesmo.

E38. Um método de inibição da adesão de leucócitos-células endoteliais mediada por MAdCAM compreendendo o contacto das células endoteliais com o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma de E 1-3 e 5-17 ou uma porção de ligação ao antigénio do mesmo.

E39. Um método para inibição da adesão, migração e infiltração de leucócitos mediadas por MAdCAM em tecidos compreendendo o passo de contacto das células endoteliais com o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma de E 1-3 e 5-17 ou uma porção de ligação ao antigénio do mesmo.

E40. Um método de inibição de adesão celular dependente de  $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM compreendendo o passo de contacto das células que expressam MAdCAM humano com o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma de E 1-3 e 5-17 ou porção de ligação ao antigénio do mesmo.

E41. Um método para inibição do recrutamento de linfócitos mediado por MAdCAM para o tecido linfóide gastrointestinal compreendendo o passo de contacto das células que expressam MAdCAM humano com o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma de E 1-3 e 5-17 ou porção de ligação ao antigénio do mesmo.

E42. Um anticorpo monoclonal ou uma porção de ligação ao antigénio do mesmo que se liga especificamente a

MAdCAM, em que o referido anticorpo ou porção do mesmo compreende uma ou mais sequências de aminoácidos FR1, FR2, FR3 ou FR4 de um anticorpo monoclonal humano seleccionado do grupo consistindo em: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod.

E43. O anticorpo monoclonal humano ou porção de ligação ao antigénio de acordo com E1, em que o anticorpo compreende:

(a) uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos da cadeia pesada de um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo consistindo em: .7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod;

(b) uma sequência de aminoácidos da cadeia leve que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos da cadeia leve de um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo consistindo em: .7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod;

(c) ambas (a) e (b); ou

(d) (a), (b) ou (c), com ou sem a sequência sinal.

E44. Um método para diagnosticar um distúrbio

caracterizado pela circulação de MAdCAM humano solúvel compreendendo os passos de: (1) contacto de uma amostra biológica com o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma de E 1-3 e 5-17 ou uma porção de ligação ao antigénio e (2) detecção da ligação.

E45. Um método para a detecção de inflamação num indivíduo compreendendo os passos de: (1) administração ao referido indivíduo do anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma de E 1-3 e 5-17 em que o referido anticorpo ou porção do mesmo está marcado de forma detectável e (2) detecção da ligação.

E46. Um kit de diagnóstico compreendendo o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma de E1-3 e 5-17 ou porção de ligação ao antigénio.

E47. A composição farmacêutica de acordo com E18 compreendendo ainda um ou mais de outros agentes anti-inflamatórios ou imunomoduladores.

E48. A composição farmacêutica de acordo com E47, em que um ou mais de outros agentes anti-inflamatórios ou imunomoduladores são seleccionados do grupo consistindo em: corticosteróides, amino-salicilatos, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, FK506, IL-10, GM-CSF, rapamicina, anti-TNF $\alpha$  e antagonistas das moléculas de adesão.

E49. Uma vacina compreendendo uma quantidade eficaz do anticorpo humano de acordo com qualquer uma de

E1-3 e 5-17 ou porção de ligação ao antígeno e um veículo farmacêuticamente aceitável.

E50. A vacina de acordo com E49, em que a vacina é mucosal.

E51. Um método de detecção do efeito de administração de um anticorpo inibidor anti-MAdCAM ou porção de ligação ao antígeno do mesmo a um indivíduo compreendendo os passos de:

(a) administração a um indivíduo de um anticorpo monoclonal humano que se liga especificamente a MAdCAM; e

(b) determinação se existe um aumento nos níveis de leucócitos circulantes que expressam  $\alpha_4\beta_7$ .

E52. O método de acordo com E51, em que os referidos leucócitos são linfócitos.

E53. O método de acordo com E51, em que o referido aumento nos níveis de leucócitos circulantes que expressam  $\alpha_4\beta_7$  é determinado por análise de FACS.

Chave:

Sequência sinal: letra minúsculas sublinhadas.

Alterações de aminoácidos nas sequências dos anticorpos anti-MAdCAM modificados comparativamente com as sequências parentais: letras maiúsculas sublinhadas.

SEQ ID NO:1

Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de 1.7.2

```

1  atggagtttg ggctgagctg gattttcctt gctgctat ttt taaaagggtgt
51 ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTGAAGCCTG
101 GGGGGTCCCT TAGACTCTCC TGTGTAGCCT CTGGATTAC TTTCACTAAC
151 GCCTGGATGA TCTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 TGGCCGTATT AAAAGGAAAA CTGATGGTGG GACAACAGAC TACGCTGCAC
251 CCGTGAAAGG CAGATTCACC ATCTCAAGAG ATGATTCAAA AAACACGCTG
301 TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAAAACCGAG GACACAGCCG TGTATTACTG
351 TACCACAGGG GGAGTGGCTG AGGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA
401 CCGTCTCCTC AGCCTCCACC AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCGCCC
451 TGCTCCAGGA GCACCTCCGA GAGCACAGCG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA
501 GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTG GTGGAACCTCA GCGCTCTGA
551 CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCAGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC
601 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAACTTCG GCACCCAGAC
651 CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA
701 CAGTTGAGCG CAAATGTTGT GTCGAGTGCC CACCGTGCCC AGCACCACCT
751 GTGGCAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCTT
801 CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACGTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC
851 ACGAAGACCC CGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
901 CATAATGCCA AGACAAAGCC ACGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTTCCG
951 TGTGGTCAGC GTCCTCACC GGTGACCA GGAAGGCTG AACGGCAAGG
1001 AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCAGCCCC CATCGAGAAA
1051 ACCATCTCCA AAACCAAGG GCAGCCCCGA GAACCAAGG TGTACACCTT
1101 GCCCCATCC CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC
1151 TGGTCAAAGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
1201 GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCACA CCTCCCATGC TGGACTCCGA
1251 CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC
1301 AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC
1351 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGTAAT GA

```

SEQ ID NO. 2

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 1.7.2

```

1  mefglswifl aailkgvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CVASGFTFTN
51 AWMIWVRQAP GKGLEWVGRI KRKTDGGTTD YAAPVKGRFT ISRDDSKNTL
101 YLQMNSLKTE DTAVYYCTTG GVAEDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP
151 CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
201 SLSSVTVPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP
251 VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV
301 HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVRQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK
351 TISKTKQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN
401 GQPENNYKTT PPMILDSGSG FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN
451 HYTQKSLSLG PGK

```

SEQ ID NO. 3

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 1.7.2

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg
51  atccagtggg GATATTGTGA TGACTCAGTC TCCACTCTCC CTGCCCCGTCA
101 CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CAAAGTAATG GATACAACTA TTTGGATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGGCA
201 GTCTCCACAG CTCCTGATCT ATTTGGGGTTC TAATCGGGCC TCCGGGGTCC
251 CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT
351 ACAAACTATC ACCTTCGGCC AAGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAACTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACTCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

SEQ ID NO. 4

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de 1.7.2

```

1   mrlpaqlql lmlwvqssq DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL
51  QSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQALQTI TFGQGRLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREAV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLK
202 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

SEQ ID NO. 5

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 1.8.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg gattttcctt gctgctattt taaaaggtgt
51   ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTGAAGCCTG
101  GGGGGTCCCT TAGACTCTCC TGTGTAGTCT CTGGATTAC TTTACTAAC
151  GCCTGGATGA TCTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201  TGGCCGTATT AAAAGGAAAA CTGATGGTGG GACAACAGAC TACGCTGCAC
251  CCGTGAAAGG CAGATTCACC ATCTCAAGAG ATGATTCAA AAACACGCTG
301  TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAAAACCGAG GACACAGCCG TGTATTACTG
351  TACCACAGGG GGAGTGGCTG AGGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA
401  CCGTCTCCTC AGCCTCCACC AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCGCCC
451  TGCTCCAGGA GCACCTCCGA GAGCACAGCG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA
501  GGACTIONTC CCCGAACCGG TGACGGTGTG GTGGAAC TCA GGCCTCTGA
551  CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCAGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC
601  TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAACTTCG GCACCCAGAC
651  CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA
701  CAGTTGAGCG CAAATGTTGT GTCGAGTGCC CACCGTGCCC AGCACCACCT
751  GTGGCAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAACCCA AGGACACCTT
801  CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACGTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC
851  ACGAAGACCC CGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
901  CATAATGCCA AGACAAAGCC ACGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTTCCG
951  TGTGGTCAGC GTCCTCACC GGTGTGCACCA GGACTIONTC AACGGCAAGG
1001 AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCAGCCCC CATCGAGAAA
1051 ACCATCTCCA AAACCAAAGG GCAGCCCCGA GAACACAGG TGTACACCTT
1101 GCCCCATCC CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC
1151 TGGTCAAAGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
1201 GGGCAGCCCG AGAACAACTA CAAGACCACA CCTCCCATGC TGGACTCCGA
1251 CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC
1301 AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC
1351 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGTAAAT GA

```

SEQ ID NO. 6

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 1.8.2

```

1   mefglawifl aailkgvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CVVSGFTFTN
51   AWMIWVRQAP GKLEWVGRI KRKTDGGTTD YAAPVKGRFT ISRDDSKNTL
101  YLQMNSLKT E DTAVYYCTTG GVAEDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP
151  CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
201  SLSSVTVPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP
251  VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV
301  HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK
351  TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN
401  GQPENNYKTT PPMLDSGSP FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN
451  HYTKSLSL S PGK

```

SEQ ID NO. 7

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 1.8.2

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg
51  atccagtgagg GATATTGTGA TGACTCAGTC TCCACTCTCC CTGCCCCGTCA
101 CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CAAAGTAATG GATTCAACTA TTTGGATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGGCA
201 GTCTCCACAG CTCCTGATCT ATTTGGGTTT TAATCGGGCC TCCGGGGTCC
251 CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGTGCGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT
351 ACAAACTATC ACCTTCGGCC AAGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACCTCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

SEQ ID NO. 8

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de  
1.8.2

```

1   mrlpaqllg1 lmlwvsgssg DIVMTQSPLS LPVTFGEPAS ISCRSSQSLL
51  QSNGFNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQALQTI TFGQGTREI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLK
202 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```



SEQ ID NO.9

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 6.14.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGACTCAC CTTTAACAAT
151 TCTGCCATGA CCTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCAACTACT AGTGAAGTG GTGGTACCAC ATACTACGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGGTT CACCATCTCC AGAGACTCTC CCAAGAACAC GCTCTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCCGTATATT ACTGTGCGGC
351 CCGTGGATAC AGCTATGGTA CGACCCCTA TGAGTACTGG GGCCAGGGAA
401 CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCTTCCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC
451 CTGGCGCCCT GTTCCAGGAG CACCTCCGAG AGCACAGCCG CCCTGGGCTG
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCAGT GACGGTGTCT TGGAACTCAG
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCCTCA
601 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
651 CACGAAGACC TACACCTGCA ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
701 TGGACAAGAG AGTTGAGTCC AAATATGGTC CCCCATGCCC ATCATGCCCA
751 GCACCTGAGT TCCTGGGGGG ACCATCAGTC TTCTGTCTCC CCCCAAAACC
801 CAAGGACACT CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGCGTGGTGG
851 TGGACGTGAG CCAGGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAT
901 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA
951 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
1001 TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCCTCC
1051 TCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAGCCACA
1101 GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCAGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA
1151 GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
1201 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGAACA CGCCTCCCGT
1251 GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAGGCTA ACCGTGGACA
1301 AGAGCAGGTG GCAGGAGGGG AATGTCCTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG
1351 GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCTGGGTAA
1401 ATGA

```

SEQ ID NO. 10

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 6.14.2

```

1   mefglswlfl vailkgvqcE VQLLESGLGL VQPGSLRLS CAASGLTFNN
51  SAMTWVRQAP GKGLEWVSTT SGSGGTYYA DSVKGRFTIS RDSPKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCAARGY SYGTPPYEW GQGLVTVSS ASTKGPSVFP
151 LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSV HTFPAVLQSS
201 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP
251 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
351 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
401 WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMRH
451 ALHNHYTQKS LSLSLGK

```

SEQ ID NO.11

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 6.14.2

```

1   atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct
51  ccgagggggcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT AGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCGGAGC
151 ATTAGCAGCT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 AGTCCTGATC TTTTTTGTGT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC CCATCAAGGT
251 TCAGTGGCAG TGGCTCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGTCTG
301 CAACCTGAAG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CAACAGAATT ACATTCCCCC
351 TATTACCTTC GGCCAGGGGA CACGACTGGA GATCAGACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA G

```

SEQ ID NO. 12

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de 6.14.2

```

1   mdmrvpaql l gllllwlrga rcDIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRASRS
51  ISSYLNWYQQ KPGKAPKVL IFVSSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTIS
101 QPEDFATYYC QQNYIPPITF GQGTRLEIRR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSL
202 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

SEQ ID NO. 13

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 6.22.2

```

1   atggagtttg ggctgaqctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51   ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101  GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGACACAC CTTCAGTAGC
151  GATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201  GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATATTATGCA GACTCCGTGA
251  AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301  CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTATATT ACTGTGCGAG
351  AGATCCCGGC TACTATTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG
401  TCACCGTCTC CTCAGCTTCC ACCAAGGGCC CATCCGTCTT CCCCCTGGCG
451  CCCTGCTCCA GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCCGCCCTGG GCTGCCTGGT
501  CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC
551  TGACCAGCGG CGTGACACAC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
601  TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAGCT TGGGCACGAA
651  GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
701  AGAGAGTTGA GTCCAAATAT GGTCCCCCAT GCCCATCATG CCCAGCACCT
751  GAGTTCCTGG GGGGACCATC AGTCTTCTG TTCCCCCAA AACCCAAGGA
801  CACTCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACGTGCGTG GTGGTGGACG
851  TGAGCCAGGA AGACCCGAG GTCCAGTTCA ACTGGTACGT GGATGGCGTG
901  GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT TCAACAGCAC
951  GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAACG
1001 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGGCCCTCC GTCTTCCATC
1051 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCAGAGAG CACAGGTGTA
1101 CACCCTGCCC CCATCCCAGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA
1151 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TACCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG
1201 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCGCGCCTC CCGTGCTGGA
1251 CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAG GCTAACCCTG GACAAGAGCA
1301 GGTGGCAGGA GGGGAATGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG
1351 CACAACCACT ACACACAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCTGG GTAAATGA

```

SEQ ID NO. 14

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 6.22.2

```

1   mefglswvfl vallrgvgcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGHTFSS
51   DGMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101  QMNSLRAEDT AVYYCARDPG YYYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA
151  PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPPPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201  YSLSSVVTVP SSSLGKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPSCPAP
251  EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
301  EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI
351  EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
401  SNGQPENNYK TAPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSEVMHEAL
451  HNHYTQKSLS LSLGK

```

SEQ ID NO. 15

Sequência nucleotídica da cadeia leve capa 6.22.2

```

1   atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcttc
51  caggggtGAA ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC
101 CAAAAGAGAA AGTCACCATC ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG AATTGGTAGT
151 AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT CAGTCTCCAA AACTCCTCAT
201 CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG TTCAGTGGCA
251 GTGGATCTGG GACAAATTTC ACCCTCACCA TCAATGGCCT GGAAGCTGAA
301 GATGCTGCAA CTTATTACTG TCATCAGAGT GGTCGTTTAC CGCTCACTTT
351 CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG AACTGTGGCT GCACCATCTG
401 TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT
451 GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
501 GAAGGTGGAT AACGCCCCTC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG
551 AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG
601 AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA
651 TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT
701 AGTGA

```

SEQ ID NO. 16

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de 6.22.2

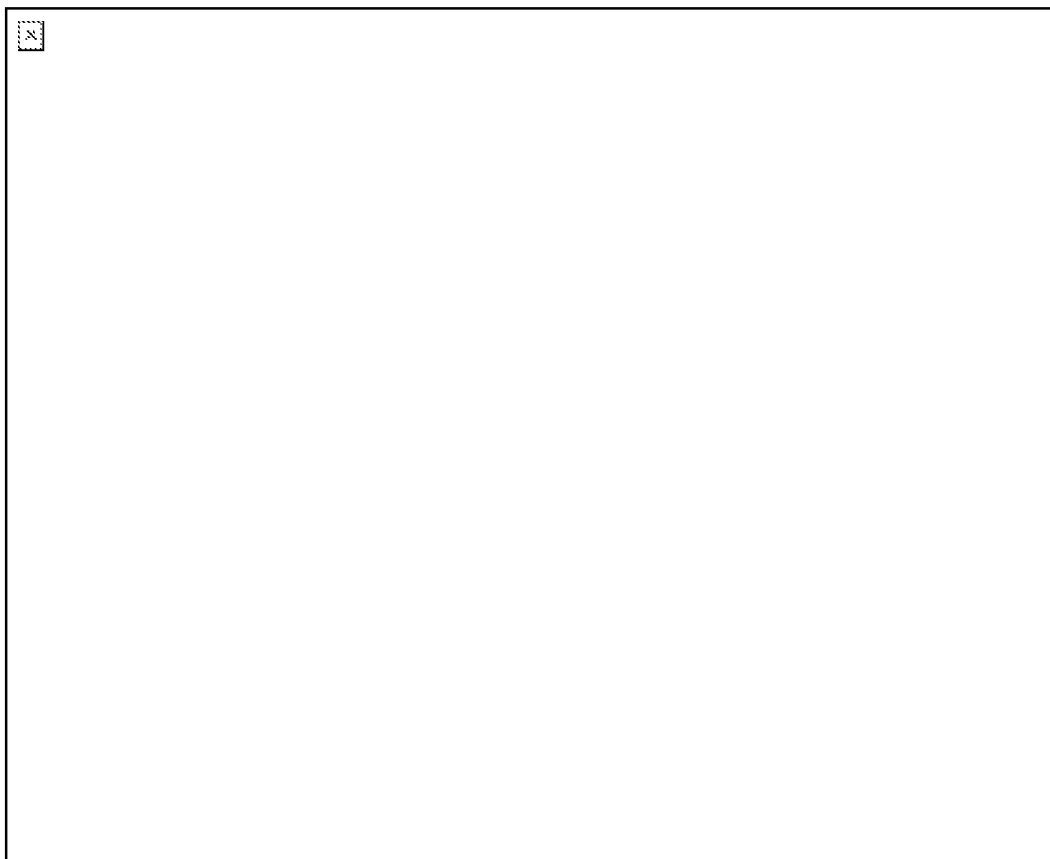
```

1   mlpsqligfl llwvpaargE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQRIGS
51  SLHWYQQKPD QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGSGTNF TLTINGLEAE
101 DAATYYCHQS GRLPLTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

```

SEQ ID NO. 17

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 6.34.2



SEQ ID NO. 18

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 6.34.2

```
1  mefglswwfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
51  YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI SNDGNNKYIA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLSAEDT AVYYCARDST AITYYYYGMD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV
151 FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
201 SSGLYSLSSV VTPSSSLGT KTYTCNVDHK PENTKVDKRV ESKYGPPCPS
251 CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY
301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVELTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351 PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM
451 HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
```

SEQ ID NO. 19

Sequência de nucleótidos para a cadeia leve capa de 6.34.2

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct
51  cccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT CGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAAAT
151 ATTAGTAGCT ATTTAAATTG GTTTCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCGGTTTGAA GCGTGGGGTC CCATCACGGT
251 TCAGTGGTAG TGGATCTGGG ACAGATTTCa CTCTCACCAT CAGGACTCTG
301 CAACCTGATG ATTTTGCAAC TTACTCCTGT CACCAGAGTT ACAGTCTCCC
351 ATTCACTTTC GGCCCTGGGA CCAAAGTGGA TATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCACTTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA GTGA

```

SEQ ID NO. 20

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de 6.34.2

```

1   mdmrvpaql1 gl111wlrga rcDIQMTQSP SSLASVGD R VTITCRASQN
51  ISSYLNWFQQ KPGKAPKLLI YAASGLKRGV PSRFSGSGSG TDFTLTIRTL
101 QPDDFATYSC HQSYSLPPTF GPGTKVDIKR TVAAPSVPIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSPVTKS FNRGEC

```

SEQ ID NO. 21

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 6.67.1

```

1   atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51   cctgtcccCAG GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101  CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCACTGTCT CTGGTGACTC CATCAGTAGT
151  AACTATTGGA GCTGGATCCG GCAGCCCGCC GGAAGGGAC TGGAGTGGAT
201  TGGGCGTATC TATACCAGTG GGGGCACCAA CTCCAACCCC TCCCTCAGGG
251  CTCGAGTCAC CATTTTAGCA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCTCTGAAA
301  CTGAGTTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351  TCGTATTACT ATAATTCGGG GACTTATTCC ATCCTTCTTT GACTACTGGG
401  GCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCCTCAG CTTCCACCAA GGGCCCATCC
451  GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCCGC
501  CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCAGTG ACGGTGTCGT
551  GGAAGTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCCTA
601  CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651  CAGCTTGGGC ACGAAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701  ACACCAAGGT GGACAAGAGA GTTGAGTCCA AATATGGTCC CCCATGCCCCA
751  TCATGCCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC
801  CCGAAAACCC AAGGACACTC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACGT
851  GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CCGAGGTCCA GTTCAACTGG
901  TACGTGGATG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
951  GCAGTTCAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
1001 AGGACTGGCT GAACGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC
1051 CTCCCGTCTT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
1101 AGAGCCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA
1151 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTACCC CAGCGACATC
1201 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC
1251 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTTAC AGCAGGCTAA
1301 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ATGTCTTCTC ATGCTCCGTG
1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACA CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
1401 TCTGGGTAAA TGA

```

SEQ ID NO. 22

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 6.67.1

```

1   mkhlwfflll vaaprwvlS QVLQESGPGL VKPSETLSLT CTVSGDSI68
51   NYWSWIRQPA GKGLEWIGRI YTSGGTNSNP SLRGRVTILA DTSKNQFSLK
101  LSSVTAADTA VYYCARDRIT IIRGLIPSFF DYWGQGLVLT VSSASTKGPS
151  VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201  QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TRTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPFCP
251  SCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW
301  YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG
351  LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
401  AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV
451  MHEALHNHYT QKSLSLSLKG

```

SEQ ID NO. 23

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 6.67.1

```

1   atggtggtgc agacccaggt cttcatttct ctggtgctct ggatctctgg
51  tgcctacggg GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA
151 TACAGCTCCA ACAATAAGAC CTACTTAGCT TGGTACCAAC AGAAACCAAG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTTACTGGGC ATCTATACGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCAGTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCACC
301 ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGGCA GTTTATTTCT GTCAACAATA
351 TTATAGTATT CCTCCCCTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACTTCTA
501 TCCAGAGAGG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG
551 GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA
651 AGTCTACGCC TCGGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA
701 AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGTGA

```

SEQ ID NO. 24

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de 6.67.1

```

1   mvlqtqvfis lllwisgayg DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL
51  YSSNNKTYLA WYQQKPRQPP KLLIYWASIR EYGVDPDRFSG SGSGTDFTLT
101 ISSLQAEDVA VFYFCQQYYSI PPLTFGGGK VBIKRTVAAP SVFIFPPSDE
151 QLKSGTASVV CLLNMFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSY
201 SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C

```



SEQ ID NO. 25

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 6.73.2

```

1   atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatth taaaagggtgt
51   ccagtgtGAG GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGACTTG GTCCAGCCTG
101  GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTTAGAAGT
151  TATGCCATGA ACTGGGTCCG ACAGGCTCCA GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201  CTCAGTTATT AGTGGTCTGT GTGGTACTAC ATACTACGCA GACTCCGTGA
251  AGGGCCGGTT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301  CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACGCG GCCGTATATT ACTGTGCGAA
351  GATAGCAGTG GCTGGAGAGG GGCTCTACTA CTACTACGGT ATGGACGTCT
401  GGGGCCAAGG GACCACGGTC ACCGTCTCCT CAGCTTCCAC CAAGGGCCCCA
451  TCCGTCTTCC CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCTCCG AGAACACAGC
501  CGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT
551  CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC
601  CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC
651  TAGCAGCTTG GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCCCA
701  GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCCCCCATGC
751  CCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCCTGGGG GGACCATCAG TCTTCCTGTT
801  CCCCCCAAAA CCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851  CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCGAGGT CCAGTTCAAC
901  TGGTACGTGG ATGGCGTGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA
951  GGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGTC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCCTCCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCAGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCAGCGAC
1201 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAGGC
1301 TAACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACACAGAAGA GCCTCTCCCT
1401 GTCTCTGGGT AAATGATAG

```

SEQ ID NO. 26

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 6.73.2

```

1   mefglswlfl vailkqvqcE VQLLESGGDL VQPGGSLRLS CAASGFTFRS
51   YAMNWVRQAP GKGLEWVSVI SGRGGTTYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101  QMNSLRAEDA AVYYCAKIAV AGEGLYYYYG MDVWGQGTIV TVSSASTKGP
151  SVFPLAPCSR STSENTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV
201  LQSSGLYSLs SVVTVPSSSL GTKTYTCNVD HKPSNTKVDK RVESKYGPPC
251  PSCPAPEFLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN
301  WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
351  GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
401  IAVEWESNGQ PENNYKITPP VLDSDGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS
451  VMHREALHNHY TQKSLSLSLG K

```

SEQ ID NO. 27

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 6.73.2

```
1   atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctectgc tactctggct
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT AGGTGACAGA GTCACCTTCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAAC
151 ATTACCAACT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AGGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCGT CCAGTTTGCC AAGAGGGGTC CCATCAAGGT
251 TCCGTGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGTCTG
301 CAACCTGAAG ATTTTGCAAC TTACTIONGT CAACAGAGTT ACAGTAATCC
351 TCCGGAGTGC GGTTTTGGCC AGGGGACCAC GCTGGATATC AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA
```

SEQ ID NO. 28

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de 6.73.2

```
1   mdmrvpaql1 gl111wlrga rcDIQMTQSP SSSLASVGDR VTFTCRASQN
51  ITNYLNWYQQ KPGKAPKLLI YAASSLPRGV PSRFRGSGSG TDFTLTISSL
101 QPEDFATYYC QSYSNPPEC GFGQGTLLDI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREKAV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLK
201 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
```

SEQ ID NO. 29

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 6.77.1

```

1   atggaactgg ggctccgctg ggttttcctt gttgctatth tagaagggtgt
51   ccagtgtgag GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTCAAGCCTG
101  GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTACAC CTTCAGTAGC
151  TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGGAAAGGGG TGGAGTGGGT
201  CTCATCCATT AGTAGTAGTA GTAGTTACAT ATACTACGCA GACTCAGTGA
251  AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC ACTGTATCTG
301  CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351  AGATGGGTAT AGCAGTGGCT GGTCTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG
401  TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCTTC CACCAAGGGC
451  CCATCCGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC
501  AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
551  TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCCGGCT
601  TGCTTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651  CTCCAGCAGC TTGGGCACGA AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAGC
701  CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGAGAGTTG AGTCCAAATA TGGTCCCCCA
751  TGCCCATCAT GCCCAGCACC TGAGTTCCTG GGGGGACCAT CAGTCTTCCT
801  GTTCCCCCCA AAACCAAGG ACACTCTCAT GATCTCCCGG ACCCTGAGG
851  TCACGTGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCAGG AAGACCCCGA GGTCCAGTTC
901  AACTGGTACG TGGATGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG
951  GGAGGAGCAG TTCAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC
1001 TGACCCAGGA CTGGCTGAAC GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
1051 AAAGCCCTCC CGTCCTCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAGGGGCA
1101 CCCCAGAGAG CCACAGGTGT ACACCTGCGC CCCATCCCAG GAGGAGATGA
1151 CCAAGAACCA GGTGAGCTGT ACCTGCTTGG TCAAAGGCTT CTACCCGAGC
1201 GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACACTACAA
1251 GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA
1301 GGCTAACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGG AGGGGAATGT CTTTTACGCG
1351 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACACAGA AGAGCCTCTC
1401 CCTGTCTCTG GGTAAATGAT AGGAATTCTG ATGA

```

SEQ ID NO. 30

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 6.77.1

```

1   melglrwvfl vailegvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGFTFSS
51   YSMNWVRQAP GKGLEWVSSI SSSSSYIYYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL
101  QMNSLRAEDT AVYYCARDGY SSGWSYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG
151  PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201  VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
251  CPSCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
301  NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
351  KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
401  DIAVEWESNG QPENNYKTFP FVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSR
451  SVMHEALHNN YTQKSLSLSL GK

```

SEQ ID NO. 31

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 6.77.1

```

1   atgaggetcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgca GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CTCTTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA ACTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CTTAGTGATG GAAAGACCTA TTTGAATTGG TACCTGCAGA AGCCCGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGACAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGGTT TATTCCTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTATG TGCAGTTTTG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCAGCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID NO. 32

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de 6.77.1

```

1   mrlpagllgl lmlwipqssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCNSSQSLL
51  LSDGKTYLW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YSCMQSIQLM CSFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYFPREK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSTLTLSKAD YBKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

SEQ ID NO. 33

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 7.16.6

```

1   atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc
51   ccactccCAG GTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101  GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC
151  TATGGTATCA ACTGGGTGCG ACAGGCCCCT GGACAAGGGC TTGAGTGGAT
201  GGGATGGATC AGCGTTTACA GTGGTAACAC AAATATGCA CAGAAGGTCC
251  AGGGCAGAGT CACCATGACC GCAGACACAT CCACGAGCAC AGCCTACATG
301  GACCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG
351  AGAGGGTAGC AGCTCGTCCG GAGACTACTA TTACGGTATG GACGTCTGGG
401  GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
451  GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
501  CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCTGT
551  GGAATTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGTGTCTCTA
601  CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651  CAATTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701  ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
751  CCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCC
801  AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851  TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901  GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAGCCAC GGGAGGAGCA
951  GTTCAACAGC ACGTTCCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1401 GGGTAAATGA

```

SEQ ID NO. 34

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 7.16.6

```

1   mdwtwsilfl vaaatgahsQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTS
51   YGINWVRQAP GQGLEWMGWI SVYSGNTINYA QKVQGRVMT ADTSTSTAYM
101  DLRLRSDDT AVYYCAREGS SSSGDYYYGM DVWGQGTITV VSSASTKGPS
151  VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVETFPAYL
201  QSSGLYSLSS VVTVPSSNFG TQTYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP
251  PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY
301  VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLT VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351  PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401  VEWESNGQPE NNYKTTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
451  HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

SEQ ID NO. 35

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 7.16.6

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgca GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CATACTGATG GAACGACCTA TTTGTATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGATT TATTACTGCA TGCAAATAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTTC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID NO. 36

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de 7.16.6

```

1   mrlpaqlql lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL
51  HTDGTTYLYW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGI YYCMQNIQLP WTFQGQTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQBSVTE QDSKDYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

SEQ ID NO. 37

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 7.20.5

```

1   atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51  cctgtcccCAG GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCAGTGTCT CTGGTAGCTC CATCAGTAGT
151 TACCAGTGGG ACTGGATCCG GCAGCCCGCC GGGAAAGGGAC TGGAGTGGAT
201 TGGGCGTATC TATACCAAGT GGAGCACCAA CTACAACCCC TCCCTCAAGA
251 GTCGAGTCAC CATGTCTACT GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAG
301 CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351 GGGGGTCAGG TATTACTATG CTTCGGGGAG TTATTACTAC GGTCTGGACG
401 TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAGGGC
451 CCATCGGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC
501 AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
551 TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCCAGCT
601 GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651 CTCCAGCAAC TTCGGCACCC AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
701 CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTCGAG
751 TGCCCCACGT GCCCAGCACC ACCTGTGGCA GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
801 CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851 CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCGAGGT CCAGTTCAAC
901 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCACGGGA
951 GGAGCAGTTC AACAGCACGT TCCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTTGTGC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCCCTCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAACCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
1201 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACACCTCCC ATGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
1301 TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
1401 GTCTCCGGGT AAATGA

```

SEQ ID NO. 38

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 7.20.5

```

1   mkhlwfflll vaaprwlsQ VQLQESGPGL VKPSETLSLT CTVSGSSISS
51  YHWNWIRQPA GKGLEWIGRI YTSGSTNYNP SLKSRVTMSL DTSKNQFSLK
101 LSSVTAADTA VYYCAREGVR YYYASGSYYY GLDVWGQGT VTVSSASTKG
151 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201 VLQSSGLYSL SSVVTVPSN FGTQYTCNV DHKPSNTKVD KTVKCCVE
251 CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN
301 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK
351 GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
401 IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSDSGFPL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS
451 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

```

SEQ ID NO. 39

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 7.20.5

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaattgctct gggtctctgg
51  atccagtgggg GATATTGTGA TGA CTCAGTC TCCACTCTCC CTGCCCCGTCA
101 CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CATGGTAATG GATACAATA TTTGGATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGGCA
201 GTCTCCACAG CTCCTGATCT ATTTGGGTTC TAATCGGGCC TCCGGGGTCC
251 CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT
351 ACAAACCTCTC ACTTTCGGCG GAGGGACCAA GGTGGAGATC AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACCTCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

SEQ ID NO. 40

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de  
7.20.5

```

1   mrlpaqllgl lmlwvsgssg DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL
51  HGNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQALQTL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IPPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
201 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```



SEQ ID NO. 41

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 7.26.4

```

1   atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc
51  ccactccCAG GTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAGGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC
151 TATGGTATCG ACTGGGTGCG ACAGGCCCCCT GGACAAGGGC TTGAGTGGAT
201 GGGATGGATC AGCGTTTACA GTGGTAACAC AAACATATGCA CAGAAGCTCC
251 AGGGCAGAGT CACCATGTCC ACAGACACAT CCACGAGCAC AGCCTACATG
301 GAGCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGAGGGTAGC AGCTCGTCCG GAGACTACTA CTACGGTATG GACGTCTGGG
401 GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCAGTG ACGGTGTCGT
551 GGAAGTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTTA
601 CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
751 CCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTTCCTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
1051 CCAGCCCCCA TTGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGGTACAGCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 TGCGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1402 GGGTAAATGA

```

SEQ ID NO. 42

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 7.26.4

```

1   mdwtwsilfl vaaatqahsQ VQLVQSGABV KKPGASVKVS CEASGYTPTS
51  YGIDWVRQAP GQGLEWMGWI SVYSGNTNYA QKLQGRVTMS TDTSTSTAYM
101 ELRSLRSDDT AVYYCAREGS SSSGDYYYGM DVWGQGTIVT VSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSSNFG TQTYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP
251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY
301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351 PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VEWESNGQPE NNYKTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
451 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

SEQ ID NO. 43

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 7.26.4

```

1   atgaggetcc ctgetcaget cctgggggetg ctaagtctct ggatacctgg
51  atccagtgcg GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAATCA GAGCCTCCTG
151 TATAGTGATG GAAAGACCTA TTTGTTTTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGATTC TCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTCACT ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTTC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCCTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID NO. 44

Sequência proteica prevista para a cadeia leve capa de 7.26.4

```

1   mrlpaqlql lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSNQSLL
51  YSDGKTYLFW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNR FSGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQSIQLP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

SEQ ID NO. 45

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 9.8.2

```

1  atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtcag GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTAC CTTCAGTAGC
151 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAGTTATA TGGTATGATG GAAGTAATGA ATACTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 GGGGGCGTAC CACTTTGCCT ACTGGGGCCA GGGAACCCTG GTCACCGTCT
401 CCTCAGCTTC CACCAAGGCG CCATCCGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC
451 AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA
501 CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC CTGACCAGCG
551 CCGTGACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC
601 AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACGA AGACCTACAC
651 CTGCAACGTA GATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGAGAGTTG
701 AGTCCAAATA TGGTCCCCCA TGCCCATCAT GCCCAGCACC TGAGTTCCTG
751 GGGGGACCAT CAGTCTTCCT GTTCCCCCCA AAACCCAAGG ACACTCTCAT
801 GATCTCCCGG ACCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCAGG
851 AAGACCCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGATGGCGT GGAGGTGCAT
901 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA CGTACCGTGT
951 GGTCAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAC GGCAAGGAGT
1001 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCCCTC CGTCCTCCAT CGAGAAAACC
1051 ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAG CCACAGGTGT ACACCCTGCC
1101 CCGTCCAG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG
1151 TCAAAGGCTT CTACCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA TGGAGTGGG
1201 CAGCCGAGGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG
1251 CTCCTTCTTC CTCTACAGCA GGCTAACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGG
1301 AGGGGAATGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC
1351 TACACACAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCTG GGTAAATGA

```

SEQ ID NO. 46

Sequência proteica prevista para a cadeia pesada de 9.8.2

```

1  mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
51  YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI WYDGSNEYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARGAY HFAYWGQGTI VTVSSASTKG PSVPPLAPCS
151 RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL
201 SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP CPSCPAPEFL
251 GGPSVFLPPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH
301 NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT
351 ISKAKQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
401 QPENNYKTFP PVLDSGSEFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH
451 YTQKSLSLSL GK

```

SEQ ID NO. 47

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 9.8.2

```

1   atggacatga gggtcctgc tcagtcctg gggtcctgc tgctctgget
51  ctcagtcgca ggtgccagat gtGACATCCA GATGACCCAG TCTCCATCCT
101 CCCTGTCTGC ATCTGTAGGA GACAGAGTCA CCATCACTTG CCAGGCGAGT
151 CAGGACATTA GCAACTATTT AAATTGGTAT CAGCAGAAAC CAGGGAAAGC
201 CCCTAAGCTC CTGATCTACG ATGCATCCAA TTTGGAAACA GGGGTCCCAT
251 CAAGGTTTCA TGGAAAGTGA TCTGGGACAG ATTTTACTTT CACCATCAGC
301 AGCCTGCAGC CTGAAGATAT TGCAACATAT TCCTGTCAAC ACTCTGATAA
351 TCTCTCGATC ACCTTCGGCC AGGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ACCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

SEQ ID NO. 48

Sequência proteica prevista para cadeia leve capa de 9.8.2

```

1   mdmrvpagll gllllwlsva garcDIQMTQ SPSSLSASVG DRVTITCQAS
51  QDISNYLNWY QOKPGKAPKL LIYDASNLET GVPSPRFSGSG SGTDFTFPTIS
101 SLQPEDIATY SCQHSNLSI TFGQGTRLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
201 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

SEQ ID NO. 49

Sequência de nucleótidos do domínio de ligação a MAdCAM

 $\alpha_4\beta_7$  cinomolgo

```

1   ATGGATCGGG GCCTGGCCCT CCTGCTGGCG GGGCTTCTGG GGCTCCTCCA
51  GCCGGGCTGC GGCCAGTCCC TCCAGGTGAA GCCCTGCAG GTGGAGCCCC
101 CGGAGCCGGT GGTGGCCGTG GCCCTGGGCG CCTCTCGCCA GCTCACCTGC
151 CGCCTGGACT GCGCGGACGG CGGGGCCACG GTGCAGTGCG GGGGCCCTGA
201 CACCAGCCTG GCGCGGTGCG AGTCGGACGC GGGCCGCAGC GTCCTCACC
251 TGCGCAACGC CTCGCTGTCG GCGGCCGGA CCCGTGTGTG CGTGGGCTCC
301 TCGGGGGGCC GCACCTTCCA GCACACCGTG CGGCTCCTTG TGTACGCCIT
351 CCCGGACCAG CTGACCATCT CCCCAGCAGC CCTGGTGCCT GGTGACCCG
401 AGGTGGCCTG TACGGCTCAC AAAGTCACGC CTGTGGACCC CAATGCGCTC
451 TCCTTCTCCC TGCTCCTGGG GGACCAGGAA CTGGAGGGGG CCCAGGCTCT
501 GGGCCCGGAG GTGGAGGAGG AGGAGGAGCC CCAGGAGGAG GAGGACGTGC
551 TGTTTCAGGGT GACAGAGCGC TGGCGGCTGC CGACCTTGGC AACCCTGTGC
601 CTGCCCGCGC TCTACTGCCA GGCCACGATG AGGCTGCCTG GCTTGGAGCT
651 CAGCCACCGC CAGGCCATCC CGGTCCTGCA C

```

SEQ ID NO. 50

Sequência de aminoácidos do domínio de ligação MAdCAM  $\alpha_4\beta_7$   
cinomolgo

```

1   MDRGLALLLA GLLGLLQPGC GQSLQVKPLQ VEPPEPVVAV ALGASRQLTC
51  RLDCADGGAT VQWRGLDTSL GAVQSDAGRS VLTVRNASLS AAGTRVCVGS
101 CGGRTFQHTV RLLVYAFPDQ LTISPAALVP GDPEVACTAH KVTPVDPNAL
151 SFSLLLGDQE LEGAQAALGPE VEEEEEPPQEE EDVLFRVTER WRLPTLATPV
201 LPALYCQATM RLPGLELSHR QAI PVLH

```

SEQ ID NO. 51

Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de 6.22.2  
modificado

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTAC CTTAGTAGC
151 GATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATATTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTATATT ACTGTGCGAG
351 AGATCCCGGC TACTATTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG
401 TCACCGTCTC CTCAGCTTCC ACCAAGGGCC CATCCGTCTT CCCCCTGGCG
451 CCCTGCTCTA GAAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT
501 CAAGGACTAC TTCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC
551 TGACCAGCGG CGTGACACC TTCCAGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCC TCCAGCAACT TCGGCACCCA
651 GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
701 AGACAGTTGA GCGCAAATGT TGTGTCGAGT GCCCACCCTG CCCAGCACCA
751 CCTGTGGCAG GACCGTCAGT CTTCTCTTTC CCCCCAAAC CCAAGGACAC
801 CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA
851 GCCACGAAGA CCCCAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG
901 GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCACGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT
951 CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTTGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
1001 AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCAGC CCCCATCGAG
1051 AAAACCATCT CAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC
1101 CCTGCCCCCA TCCCGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
1151 GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
1201 AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCCA TGCTGGACTC
1251 CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
1301 GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
1351 AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGTA AATGATAG

```

SEQ ID NO.52

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de 6.22.2  
modificado

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSRLRLS CAASGFTFSS
51  DGMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLR AEDT AVYYCARDPG YYYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA
151 PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTKVERKC CVECPCPAP
251 FVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE
301 VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE
351 KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
401 NGQPENNYKT TPPMLDS DGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVP SCSVMHEALH
451 NHYTQKSLSL SPGK

```

SEQ ID NO. 53

Sequência nucleotídica da cadeia leve capa de 6.22.2  
modificado

```

1   atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcttc
51  caggggtGAA ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC
101 CAAAAGAGAA AGTCACCATC ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG AATTGGTAGT
151 AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT CAGTCTCAA AACTCCTCAT
201 CAAGTATGCT TCCAGTCCT TCTCAGGGT CCCCTCGAGG TTCAGTGGCA
251 GTGGATCTGG GACAGATTTC ACCCTCACCA TCAATAGCCT GGAAGCTGAA
301 GATGCTGCAA CTTATTACTG TCATCAGAGT GGTCTGTTAC CGCTCACTTT
351 CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG AACTGTGGCT GCACCATCTG
401 TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT
451 GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
501 GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTACAG
551 AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG
601 AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCCTGCG AAGTCACCCA
651 TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT
701 AGTGA

```

SEQ ID NO. 54

Sequência de aminoácidos da cadeia leve capa de Modified  
6.22.2 modificado

```

1   mlpsqligfl llwvpasrgE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQRIGS
51  SLHWYQOKPD QSPKLLIKYA SQSFGVPSR FSGSGSGTDF TLTINSLEAE
101 DAATYYCHQS GRLPLTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNFPYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTIL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

```

SEQ ID NO. 55

Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de 6.34.2  
modificado

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCAGTAGC
151 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAGTTATA TCAAATGATG GAAATAATAA ATACTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAAAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGCGCGC TGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATAGTACG GCGATAACCT ACTACTACTA CGGAATGGAC GTCTGGGGCC
401 AAGGGACCAC GGTCACCGTC TCCTCAGCTT CCACCAAGGG CCCATCCGTC
451 TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC TAGAAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT
501 GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA
551 ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCCTGCACA CCTTCCCAGC TGTCTACAG
601 TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAA
651 CTTGGGCACC CAGACCTACA CTTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA
701 CCAAGGTGGA CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTCGA GTGCCCACCG
751 TGCCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCCTGG
851 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA TTGGTACGTG
901 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT
951 CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT
1001 GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA
1051 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCGAGAACC
1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
1151 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA CATCGCCGTG
1201 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC
1251 CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG
1301 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1351 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CAGCAGAAG AGCCTCTCC TGTCTCCGGG
1401 TAAATGATAG

```

SEQ ID NO. 56

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de 6.34.2  
modificado

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VOLVESGGGV VQGRSLRLS CAASGFTFSS
51  YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI SNDGNNKYIA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDST AITYYYYGMD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV
151 FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
201 SSGLYSLSSV VTVPSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP
251 CPAPFVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV
301 DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVSLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
351 APIEKTISKI KGQPREPOVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
401 BWESNGOPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451 EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

SEQ ID NO. 57

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 6.34.2  
modificado

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctgget
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT CGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAGT
151 ATTAGTAGCT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCGGTTTGAA GCGTGGGGTC CCATCACGGT
251 TCAGTGGTAG TGGATCTGGG ACAGATTTCa CTCTCACCAT CAGTTCTCTG
301 CAACCTGAGG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CACCAGAGTT ACAGTCTCCC
351 ATTCACTTTC GGCCCTGGGA CCAAAGTGGa TATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA GTGA

```

SEQ ID NO. 58

Sequência de aminoácidos da cadeia leve capa de 6.34.2  
modificado

```

1   mdmrvpaql1 gl1llwlrge rcDIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRASQS
51  ISSYLNWYQQ KPGKAPKLLI YAASGLKRGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL
101 QPEDFATYYC HQSYSLPFTF GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201 LTLKADYK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```



SEQ ID NO. 59

Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de 6.67.1  
modificado

```

1   atgaaacacc tgtgggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51  cctgtcccCAG GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCACTGTCT CTGGTGACTC CATCAGTAGT
151 AACTATTGGA GCTGGATCCG GCAGCCCGCC GGAAGGGAC TGGAGTGGAT
201 TGGGCGTATC TATACCAAGT GGGGCACCAA CTCCAACCCC TCCCTCAGGG
251 GTCGAGTCAC CATGTCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCTCTGAAA
301 CTGAGTTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351 TCGTATTACT ATAATTCGGG GACTTATTCC ATCCTTCTTT GACTACTGGG
401 GCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCCTCAG CTTCCACCAA GGGCCCATCC
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCTAGAAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT
551 GGAATCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTTA
601 CAGTCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
751 CCGTGCCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851 TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTTCCTGT TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCAA CAAAGGCCTC
1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1401 GGGTAAATGA TAG

```

SEQ ID NO. 60

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de 6.67.1  
modificado

```

1   mkhlwfflll vaaprwlsQ VQLQESGPGL VKPSETLSLT CTVSGDSISS
51  NYWSWIRQPA GKGLEWIGRI YTSGGTNSNP SLRGRVTMSV DTSKNQFSLK
101 LSSVTAADTA VYCARDRIT IIRGLIPSFF DYWGQGTLLV VSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSSNFG TQTYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP
251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVFQNWY
301 VDGVEVHNAK TKPRBEQFNS TFRVVSIVTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351 PAPIEKTISK TKGQPREPV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VEWESNGQPE NNYKTTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
451 HEALHNYHQ KSLSLSPGK

```

SEQ ID NO. 61

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 6.67.1  
modificado

```

1   atgggtgttgc agacccaggt cttcatttct ctggtgctct ggatctctgg
51  tgccctacggg GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTMTTA
151 TACAGCTCCA ACAATAAGAA CTACTTAGCT TGGTACCAAC AGAAACCAGG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTACTGCGC ATCTATACGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCACTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATT CACTCTCACC
301 ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGGCA GTTTATTTCT GTCAACAATA
351 TTATAGTATT CCTCCCTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTGTG TGCCCTGCTGA ATAACCTCTA
501 TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG
551 GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA
651 AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA
701 AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGTGA

```

SEQ ID NO. 62

Sequência de aminoácidos da cadeia leve capa de 6.67.1  
modificado

```

1   mvlqtgvfis lllwisgayg DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL
51  YSSNNKNYLA WYQQKPGQPP KLLIYWASIR EYGVPRDFSG SGSGTDFTLT
101 ISSLQAEDVA VFYFQQYYSI PPLTFGGGTK VEIKRTVAAP SVFIFPPSDE
151 QLKSGTASVV CLLNFFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDY
201 SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C

```

SEQ ID NO. 63

Sequência de nucleótidos da cadeia pesada de 6.77.1  
modificado

```

1   atggaactgg ggctccgctg ggttttccct gttgctatct tagaagggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTCAAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTAGTAGC
151 TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCATCCATT AGTAGTAGTA GTAGTTACAT ATACTACGCA GACTCAGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC ACTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATGGGTAT AGCAGTGGCT GGTCTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG
401 TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCTTC CACCAAGGGC
451 CCATCCGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCT AGAAGCACCT CCGAGAGCAC
501 AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
551 TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCAGCT

```

```

601  GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651  CTCCAGCAAC TTCGGCACCC AGACTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
701  CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTCGAG
751  TGCCCACCGT GCCCAGCACC ACCTGTGGCA GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
801  CCCCCAA AAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851  CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCGAGGT CCAGTCAAC
901  TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCACGGA
951  GGAGCAGTTC AACAGCACGT TCCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTGTGTC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAACCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
1201 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACACCTCCC ATGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
1301 TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTTCCTCCT
1401 GTCTCCGGGT AAATGATAG

```

SEQ ID NO. 64

Sequência proteica da cadeia pesada de 6.77.1 modificado

```

1  melqlrwvfl vailegvqce VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGPTFSS
51  YSMNWVRQAP GKGLEWVSSI SSSSSYIYYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDGY SSGWSYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG
151 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVXDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201 VLQSSGLYSL SSVVTVPSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVRKCCEVE
251 CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN
301 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKKVSNK
351 GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSR EMTKQVSLT CLVKGFYPSD
401 IAVEWESNGQ PENNYKTTTP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS
451 VMHEALHNY TQKSLSLSPG K

```

SEQ ID NO. 65

Sequência de nucleótidos da cadeia leve capa de 6.77.1 modificado

```

1  atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtga GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CTCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CTTAGTGATG GAAAGACCTA TTTGAAATGG TACCTGCAGA AGCCCGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAATTC CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGACAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTATG TGCAGTTTGG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID NO. 66

Sequência de aminoácidos da cadeia leve capa de 6.77.1  
modificado

```

1   mrlpaqllgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL
51  LSDGKTYLW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YSCMQSIQLM SSFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

SEQ ID NO. 67

Sequência de nucleótidos da cadeia leve de 7.26.4  
modificado

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaagtctct ggatacctgg
51  atccagtgcg GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 TATAGTGATG GAAAGACCTA TTTGTTTTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGATTCTCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTCACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTCC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID NO. 68

Sequência de aminoácidos da cadeia leve capa de 7.26.4  
modificado

```

1   mrlpaqllgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL
51  YSDGKTYLFW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQSIQLP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

&lt;110&gt; PFIZER INC.

ABGENIX, INC.

PFIZER LIMITED

&lt;120&gt; ANTICORPOS CONTRA MAdCAM

&lt;130&gt; P29409EP-D1-PCT

&lt;140&gt; Ainda não atribuído

&lt;141&gt; 2005-01-07

&lt;150&gt; US 60/535,490

&lt;151&gt; 2004-01-09

&lt;160&gt; 147

&lt;170&gt; Patent In Ver. 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1392

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

atggagtttg ggctgagctg gatttttcctt gctgctattt taaaagggtg ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgaagcctg ggggggccct tagactctcc 120
tgtgtagcct ctggattcac ttctactaac gcctggatga tctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt tggccgtatt aaaaggaaaa ctgatgggtg gacaacagac 240
tacgtgcac ccgtgaaagg cagattcaccc atctcaagag atgattcaaa aaacacgctg 300
tatctgcaaa tgaacagcct gaaaaccgag gacacagccg tgtattactg taccacaggg 360
ggagtggctg aggactactg gggccaggga accctggtea ccgtctcctc agcctccacc 420
aagggcccat cgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
gccctgggct gcctgtgcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
ggcgctctga ccagcgcgct gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
gtcgagtgcc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtcct cctcttcccc 780
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 840
gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960
gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggtccttc 1260
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
ccgggtaaat ga                                     1392

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 463

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Ala Ile Leu Lys Gly
 1          5          10          15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
          20          25          30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35          40          45

Thr Asn Ala Trp Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50          55          60

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

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Gly Val Ala Glu Asp Tyr Trp Gly
          115          120          125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
          130          135          140

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
          180          185          190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
          195          200          205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
          210          215          220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
          225          230          235          240

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
          245          250          255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
          260          265          270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
          275          280          285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
          290          295          300

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Phe | Arg | Val | Val | Ser |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Val | Leu | Thr | Val | Val | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Met | Leu | Asp | Ser |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu |
|     | 435 |     |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |
| 450 |     |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |

<210> 3  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

|             |            |             |             |             |             |     |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| atgaggctcc  | ctgctcagct | cctggggctg  | ctaattgctct | gggtctctgg  | atccagtggg  | 60  |
| gatattgtga  | tgactcagtc | tccactctcc  | ctgcccgtca  | cccctggaga  | gccggcctcc  | 120 |
| atctcctgca  | ggtctagtca | gagcctctctg | caaagtaatg  | gatacaacta  | tttggtattgg | 180 |
| tacctgcaga  | agccagggca | gtctccacag  | ctcctgatct  | atttgggttc  | taatcgggcc  | 240 |
| tccggggctcc | ctgacagggt | cagtggcagt  | ggatcaggca  | cagattttac  | actgaaaatc  | 300 |
| agcagagtgg  | aggctgagga | tggtgggggt  | tattactgca  | tgcaagctct  | acaaactatc  | 360 |
| accttcggcc  | aagggaacag | actggagatt  | aaacgaactg  | tggtgcacc   | atctgtcttc  | 420 |
| atcttcccgc  | catctgatga | gcagttgaaa  | tctggaactg  | cctctgttgt  | gtgcctgctg  | 480 |
| aataacttct  | atcccagaga | ggccaaagta  | cagtggaaag  | tggaataacgc | cctccaatcg  | 540 |
| ggtaactccc  | aggagagtgt | cacagagcag  | gacagcaagg  | acagcaccta  | cagcctcagc  | 600 |
| agcaccctga  | cgtgagcaa  | agcagactac  | gagaaacaca  | aagtctacgc  | ctgcgaagtc  | 660 |
| acccatcagg  | gcctgagctc | gcccgtcaca  | aagagcttca  | acaggggaga  | gtgttagtga  | 720 |

<210> 4  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

```

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

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1392

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

```

atggagtttg ggctgagctg gattttcctt gctgctattt taaaaggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgaagcctg gggggtcct tagactctcc 120
tgtgtagtct ctggattcac ttctactaac gcctggatga tctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt tggccgtatt aaaaggaaaa ctgatggtgg gacaacagac 240

```



```

tacgctgcac ccgtgaaagg cagattcacc atctcaagag atgattcaaa aaacacgctg 300
tatctgcaaa tgaacagcct gaaaaccgag gacacagccg tgtattactg taccacaggg 360
ggagtggctg aggactactg gggccaggga accctgggtca ccgtctcttc agcctccacc 420
aagggcccat cggctcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
ggcgtcttga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcttc aggactctac 600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgcccttc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctcg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840
gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 900
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcagttccg tgtggtcagc 960
gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggctctc 1020
aacaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080
gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
ccgggtaaat ga 1392

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 463

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Ala Ile Leu Lys Gly
 1             5             10             15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
      20             25             30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe
      35             40             45

Thr Asn Ala Trp Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50             55             60

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

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Gly Val Ala Glu Asp Tyr Trp Gly
      115            120            125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
      130            135            140

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

```

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 165 170 175  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 180 185 190  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
 210 215 220  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys  
 225 230 235 240  
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
 245 250 255  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320  
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 340 345 350  
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 355 360 365  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 370 375 380  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
 405 410 415  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 420 425 430  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 435 440 445  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 7  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctg atccagtgagg 60
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 120
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg caaagtaatg gattcaacta tttggattgg 180
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcggggc 240
tccggggctc ctgacagggt cagtggcagt gggtcaggca cagattttac actgaaaatc 300
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactatc 360
accttcggcc aagggacacg actggagatt aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420
atcttcccg ccatctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttagtga 720

```

<210> 8  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

```

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1                5                10                15

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

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

Leu Leu Gln Ser Asn Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50                55                60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65                70                75                80

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

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

Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
    115                120                125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                135                140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
    145                150                155                160

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Leu | Gln | Ser | Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Tyr | Glu | Lys | His | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Ser | Ser | Pro | Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     |

<210> 9  
 <211> 1404  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggactcac ctttaacaat tctgccatga cctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ctcaactact agtggaaagt gtggtaccac atactacgca 240
gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagactctc ccaagaacac gctctatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcggc ccgtggatac 360
agctatggta cgacccccta tgagtactgg ggccaggga cctgggtcac cgtctcctca 420
gcttccacca agggcccata cgtcttcccc ctggcgccct gttccaggag cactccgag 480
agcacagccg cctggggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540
tggaaactag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca 600
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 660
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 780
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 840
tgctgtggtg tggacgtgag ccaggaagac ccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 960
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat ccaggagga gatgaccaag 1140
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1320
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1380
ctctccctgt ctctgggtaa atga 1404

```

<210> 10  
 <211> 467  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Phe | Gly | Leu | Ser | Trp | Leu | Phe | Leu | Val | Ala | Ile | Leu | Lys | Gly |
| 1   |     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| Val | Gln | Cys | Glu | Val | Gln | Leu | Leu | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln |  |  |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |  |
| Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Leu | Thr | Phe |  |  |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |  |
| Asn | Asn | Ser | Ala | Met | Thr | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu |  |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |
| Glu | Trp | Val | Ser | Thr | Thr | Ser | Gly | Ser | Gly | Gly | Thr | Thr | Tyr | Tyr | Ala |  |  |  |
|     | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |  |
| Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Ser | Pro | Lys | Asn |  |  |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |  |
| Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |  |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |  |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Ala | Arg | Gly | Tyr | Ser | Tyr | Gly | Thr | Thr | Pro | Tyr | Glu |  |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |
| Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys |  |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |  |
| Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu |  |  |  |
|     | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |  |
| Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro |  |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |  |
| Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr |  |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |  |
| Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val |  |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |
| Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn |  |  |  |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |  |
| Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Ser |  |  |  |
|     | 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |  |  |  |
| Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Ser | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly |  |  |  |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |  |
| Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met |  |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln |  |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |
| Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |
| His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr |  |  |  |
|     | 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |  |

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 325 330 335  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile  
 340 345 350  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 355 360 365  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 370 375 380  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 385 390 395 400  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 405 410 415  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val  
 420 425 430  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 435 440 445  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 450 455 460  
 Leu Gly Lys  
 465

<210> 11  
 <211> 711  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgagggggcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcggagc attagcagct atttaaattg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagcccctaa agtcctgatc ttttttgtgt ccagtttgca aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagtggcag tggctctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctctg 300
caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagaatt acattccccc tattaccttc 360
ggccaggggga caccactgga gatcagacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta g 711
  
```

<210> 12  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

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

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35          40          45

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

Ala Pro Lys Val Leu Ile Phe Phe Val Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65          70          75          80

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100          105          110

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

Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130          135          140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145          150          155          160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165          170          175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180          185          190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195          200          205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210          215          220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225          230          235

```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1398

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggagggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcgt ctggacacac cttcagtagc gatggcatgc actgggtccg ccagggtcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcaattata tggatatgatg gaagtaataa atattatgca 240

```

```

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtatatt actgtgagag agatcccggc 360
tactattacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcttcc 420
accaagggcc catccgtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 480
gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccggtg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 660
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 720
ggccccccat gccatcatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg 780
ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 840
gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 900
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 1020
gtctccaaca aaggcctccc gtccctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccattcccagg aggagatgac caagaaccag 1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accgcgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1380
ctgtctctgg gtaaataga                                     1398

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 465

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

```

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

```



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | 165 | 170 | 175 |
| Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | 180 | 185 | 190 |
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | 195 | 200 | 205 |
| Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | 210 | 215 | 220 |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | 225 | 230 | 235 |
| Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Ser | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | 245 | 250 | 255 |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | 260 | 265 | 270 |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | 275 | 280 | 285 |
| Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | 290 | 295 | 300 |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | 305 | 310 | 315 |
| Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | 325 | 330 | 335 |
| Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys | 340 | 345 | 350 |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | 355 | 360 | 365 |
| Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | 370 | 375 | 380 |
| Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | 385 | 390 | 395 |
| Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Ala | Pro | Pro | Val | Leu | 405 | 410 | 415 |
| Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Arg | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | 420 | 425 | 430 |
| Ser | Arg | Trp | Gln | Glu | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | 435 | 440 | 445 |
| Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Leu | Gly | 450 | 455 | 460 |

**Lys**  
**465**

<210> 15  
 <211> 705  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 15

```

atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcttc caggggtgaa 60
attgtgctga ctcagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaagagaa agtcaccatc 120
acctgccggg ccagtcagag aattggtagt agcttacctt ggtaccagca gaaaccagat 180
cagtctccaa aactcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
ttcagtggca gtggatctgg gacaaatttc accctacca tcaatggcct ggaagctgaa 300
gatgtgcaa cttattactg tcatcagagt ggctcgttac cgctcacttt cggcgaggagg 360
accaaggtgg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agtga 705

```

<210> 16  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

```

Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
 1              5              10              15

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

Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile
      35              40              45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
 50              55              60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Thr Ile Asn Gly
      85              90              95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Gly Arg
      100              105              110

Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
      115              120              125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
      130              135              140

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu | Gln | Ser | Gly |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr | Glu | Lys | His |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Ser | Ser | Pro | Val |
|     | 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |     |     |     |     |     |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 17  
 <211> 1410  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atggaggtttg | ggctgagctg  | ggttttcctc  | gttgcctctt  | taagaggtgt  | ccagtgtcag  | 60   |
| gtgcagctgg  | tggagctctg  | gggagggcgtg | gtccagcctg  | ggaggtccct  | gagactctcc  | 120  |
| tgtgcagcct  | ctggattcac  | cttcagtagc  | tatggcatgc  | actgggtccg  | ccaggtccca  | 180  |
| ggcaaggggc  | tggagtgggt  | ggcagttata  | tcaaatagatg | gaaataataa  | atactatgca  | 240  |
| gactccgtga  | agggccgatt  | caccatctcc  | agagacaatt  | ccaaaaacac  | gctgtatctg  | 300  |
| caaatgaaca  | gcctgagcgc  | tgaggacacg  | gctgtgtatt  | actgtgctgag | agatagtacg  | 360  |
| gcgataacct  | actactacta  | cggaaatggac | gtctggggcc  | aagggaccac  | ggtcaccgtc  | 420  |
| tcctcagctt  | ccaccaaggg  | cccacccgtc  | ttccccctgg  | cgccctgctc  | caggagcacc  | 480  |
| tccgagagca  | cagccgccct  | gggctgcctg  | gtcaaggact  | acttccccga  | accggtgacg  | 540  |
| gtgtcgtgga  | actcaggcgc  | cctgaccagc  | ggcgtgcaca  | ccttccccgc  | tgtcctacag  | 600  |
| tcctcaggac  | tctactccct  | cagcagcgtg  | gtgaccgtgc  | cctccagcag  | cttgggcacg  | 660  |
| aagacctaca  | cctgcaacgt  | agatcacaag  | cccagcaaca  | ccaaggtgga  | caagagagtt  | 720  |
| gagtccaaat  | atggtcccc   | atgcccatca  | tgccagcac   | ctgagttcct  | ggggggacca  | 780  |
| tcagtcttcc  | tgttcccccc  | aaaacccaag  | gacactctca  | tgatctcccc  | gacccctgag  | 840  |
| gtcacgtgcg  | tgggtggtgga | cgtgagccag  | gaagaccccc  | aggtccagtt  | caactggtac  | 900  |
| gtggatggcg  | tggaggtgca  | taatgccaag  | acaaagccgc  | gggaggagca  | gttcaacagc  | 960  |
| acgtaccgtg  | tggtcagcgt  | cctcaccgtc  | ctgcaccagg  | actggctgaa  | cggcaaggag  | 1020 |
| tacaagtgca  | aggtctccaa  | caaaggcctc  | ccgtctctca  | tgcagaaaac  | catctccaaa  | 1080 |
| gccaaagggc  | agccccgaga  | gccacagggtg | tacacctgc   | ccccatccca  | ggaggagatg  | 1140 |
| accaagaacc  | aggtcagcct  | gacctgcctg  | gtcaaaggct  | tctaccccag  | cgacatcgcc  | 1200 |
| gtggagtggg  | agagcaatgg  | acagccggag  | aacaactaca  | agaccacgcc  | tcccgctgctg | 1260 |
| gactccgacg  | gctccttctt  | cctctacagc  | aggctaaccg  | tggacaagag  | caggtggcag  | 1320 |
| gaggggaatg  | tcttctcatg  | ctccgtgatg  | catgaggctc  | tgcacaacca  | ctacacacag  | 1380 |
| aagagcctct  | ccctgtctct  | gggtaaatga  |             |             |             | 1410 |

<210> 18  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1          5          10          15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
          20          25          30

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

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50          55          60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Thr Ala Ile Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
          115          120          125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
          130          135          140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
          145          150          155          160

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
          180          185          190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
          195          200          205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
          210          215          220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
          225          230          235          240

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
          245          250          255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
          260          265          270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
          275          280          285

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
          290          295          300

```

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 340 345 350  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 420 425 430  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460  
 Leu Ser Leu Gly Lys  
 465

<210> 19  
 <211> 714  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 19

```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tctcctctgt ctgcatctgt cggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagaat attagtagct atttaaattg gtttcagcag 180
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgata tatgctgcat ccggtttgaa gcgtgggggtc 240
ccatcacggg tcagtggtag tggatctggg acagatttca ctctcaccat caggactctg 300
caacctgatg attttgcaac ttactcctgt caccagagtt acagtctccc attcactttc 360
ggccctggga ccaaagtga tatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
cagggcctga gctcgcccg tcaaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtga 714
  
```

<210> 20  
 <211> 236

PE2177537

- 248 -

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

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

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
          35          40          45

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Gly Leu Lys Arg Gly Val
          65          70          75          80

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

Ile Arg Thr Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Ser Cys His Gln
          100          105          110

Ser Tyr Ser Leu Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
          115          120          125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          130          135          140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
          145          150          155          160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
          165          170          175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          180          185          190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          195          200          205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          210          215          220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          225          230          235

```

<210> 21

<211> 1413

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60

```

gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtcctcacc 120
tgcaactgtct ctggtgactc catcagtagt aactattgga gctggatccg gcagcccgc 180
gggaagggac tggagtggat tgggcgtatc tataccagtg ggggcaccaa ctccaacccc 240
tccttcaggg gtcgagtcac cattttagca gacacgtcca agaaccagtt ctctctgaaa 300
ctgagttctg tgaccgccgc ggacacggcc gtgtattact gtgcgagaga tcgtattact 360
ataattcggg gacttattcc atccttcttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 420
gtctcctcag cttccaccaa gggcccatcc gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 480
acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgctgc acaccttccc ggctgtccta 600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 660
acgaagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 720
gttgagtcca aatatgggtc cccatgcccc tcatgcccag cacctgagtt cctgggggga 780
ccatcagttct tcctgttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggacccct 840
gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 900
tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac 960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaacggcaag 1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcg ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc 1080
aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag 1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc 1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260
ctggactccg acggtcctt cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtg 1320
caggagggga atgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 1380
cagaagagcc tctcctgtc tctgggtaaa tga 1413

```

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 470

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 22

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1             5             10             15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
      20             25             30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile
      35             40             45

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

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

Ser Leu Arg Gly Arg Val Thr Ile Leu Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln
      85             90             95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
      100            105            110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ile Thr Ile Ile Arg Gly Leu Ile Pro Ser
      115            120            125

Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
      130            135            140

```

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 165 170 175  
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 180 185 190  
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 195 200 205  
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr  
 210 215 220  
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg  
 225 230 235 240  
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255  
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 340 345 350  
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
 420 425 430  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445



Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 465 470

<210> 23  
 <211> 729  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 23

```

atggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctgttgtctt ggatctcttg tgcctacggg 60
gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 120
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagac ctacttagct 180
tggtaccaac agaaaccaag acagcctcct aaattgtctc ttactgggc atctatacgg 240
gaatatgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttatttct gtcaacaata ttatagtatt 360
cctccctca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacgaactgt ggctgcacca 420
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg 480
tgctgtctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc 540
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 600
agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 660
tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag 720
tgtagtga                                     729

```

<210> 24  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
  1           5           10           15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
          20           25           30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
          35           40           45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
  50           55           60

Lys Pro Arg Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg
  65           70           75           80

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

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
          100          105          110

Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly

```

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 115                                                             | 120 | 125     |
| Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile |     |         |
| 130                                                             | 135 | 140     |
| Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val |     |         |
| 145                                                             | 150 | 155 160 |
| Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys |     |         |
|                                                                 | 165 | 170 175 |
| Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu |     |         |
|                                                                 | 180 | 185 190 |
| Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu |     |         |
|                                                                 | 195 | 200 205 |
| Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr |     |         |
|                                                                 | 210 | 215 220 |
| His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 240 |

Cys

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 1419

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 25

```

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaagggtg ccagtgtgag 60
gtgcagctgt tggagctctg gggagacttg gtccagcctg gggggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctttagaagt tatgccatga actgggtccg acaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ctcagttatt agtggtcgtg gtggtactac atactacgca 240
gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacgcg gccgtatatt actgtgcgaa gatagcagtg 360
gctggagagg ggctctacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 420
accgtctcct cagcttccac caagggccca tccgtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg 480
agcacctccg agaacacagc cgccctgggc tgccctggta aggactactt ccccgaccg 540
gtgacgggtg cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 600
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc tagcagcttg 660
ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 720
agagttgagt ccaaatatgg tcccccatgc ccatcatgcc cagcacctga gttcctgggg 780
ggaccatcag tcttcctggt ccccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccgacc 840
cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac 900
tggtacgtgg atggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagttc 960
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa ggcctcccgt cctccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aaggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgcccc atcccaggag 1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgccctggta aaggcttcta cccagcgac 1200
atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg 1320
tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
acacagaaga gcctctccct gtctctgggt aaatgatag 1419

```

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 471

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 26

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1           5           10           15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln
          20           25           30

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ile Ala Val Ala Gly Glu Gly Leu Tyr Tyr Tyr
          115          120          125

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

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
          145          150          155          160

Ser Thr Ser Glu Asn Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          165          170          175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          180          185          190

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          195          200          205

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
          210          215          220

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          225          230          235          240

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
          245          250          255

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

```

| 260 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met | Thr | Lys |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     | 415 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Arg | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Glu | Gly | Asn | Val | Phe | Ser |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Leu | Ser | Leu | Ser | Leu | Gly | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 27

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggtgacaga 120
gtcaccttca cttgccgggc aagtcagaac attaccaact atttaaattg gtatcagcag 180
aaaccaggga aggccccctaa gctcctgac tctgctgcgt ccagtttgcc aagaggggtc 240
ccatcaaggt tccgtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctctg 300
caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtt acagtaatcc tccggagtgc 360
ggttttggcc aggggaccac gctggatata aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420
atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540

```

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600  
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660  
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttagtga 720

<210> 28

<211> 238

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

<210> 29  
 <211> 1434  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

```

atggaactgg ggctccgctg ggttttcctt gttgctattt tagaagggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcctg gtcaagcctg ggggggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatagcatga actgggtccg ccagggtcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ctcatccatt agtagtagta gtagttacat atactacgca 240
gactcagtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatgggtat 360
agcagtggct ggtcctacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 420
gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc 480
aggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccgtgacggt tgctcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720
aagagagttg agtccaaata tgggtcccca tgcccatcat gcccgacc tgaattcctg 780
gggggacat cagtcttctt gttccccca aaaccaagg acactctcat gatctcccg 840
accctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagacccga ggtccagttc 900
aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg ggaggagcag 960
ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac 1020
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc 1080
atctccaaag ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag 1140
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgectgg tcaaaggctt ctacccagc 1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct 1260
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc 1320
aggtggcagg aggggaatgt cttttcacgc tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac 1380
tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtaaatgat aggaattctg atga 1434

```

<210> 30  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 30

```

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
  1             5             10             15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
          20             25             30

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala
          65             70             75             80

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

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

```

| 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |     |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Asp | Gly | Tyr | Ser | Ser | Gly | Trp | Ser | Tyr | Tyr | Tyr |  |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |
| Tyr | Tyr | Gly | Met | Asp | Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser |  |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |  |
| Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser |  |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |  |
| Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp |  |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |  |
| Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr |  |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |  |
| Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr |  |  |  |
|     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |
| Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys |  |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |  |
| Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp |  |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |
| Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Ser | Cys | Pro | Ala |  |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |  |
| Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro |  |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |
| Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val |  |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |
| Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |
| Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |  |
| Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |  |
| Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly |  |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |  |
| Leu | Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro |  |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |  |
| Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met | Thr |  |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |  |
| Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser |  |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |  |
| Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr |  |  |  |

405 410 415  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 420 425 430  
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe  
 435 440 445  
 Ser Arg Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 465 470

<210> 31  
 <211> 723  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 31

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg atccagtgc 60
gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca ctcttgga gcccgcctcc 120
atctcctgca actctagtca gagcctcctg cttagtgatg gaaagacctt tttgaattgg 180
tacctgcaga agcccgccca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 240
tctggagtgc cagacagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 300
agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattcctgca tgcaaagtat acagcttatg 360
tgcagttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgaa ctgtggtgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720
tga 723
  
```

<210> 32  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 32

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



Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
                             85                            90                            95  
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Ser  
                             100                            105                            110  
 Cys Met Gln Ser Ile Gln Leu Met Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
                             115                            120                            125  
 Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
                             130                            135                            140  
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
                             145                            150                            155                            160  
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
                             165                            170                            175  
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
                             180                            185                            190  
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
                             195                            200                            205  
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
                             210                            215                            220  
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                             225                            230                            235

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 1410

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 33

```

atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccaactcccag 60
gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccagc tatggtatca actgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc agcgtttaca gtggtaacac aaactatgca 240
cagaaggctc agggcagagt caccatgacc gcagacacat ccacgagcac agcctacatg 300
gacctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agagggtagc 360
agctcgtccg gagactacta ttacggtatg gacgtctggg gccaaggac cacggtcacc 420
gtctctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 480
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc 660
acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 720
gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaa gacacctca tgatctccc gaccctgag 840
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggaggagatg 1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200

```

```

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260
gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag 1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga                               1410

```

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 469

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 34

```

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

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20          25          30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35          40          45

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

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Val Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala
 65          70          75          80

Gln Lys Val Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
          85          90          95

Thr Ala Tyr Met Asp Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
          100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ser Ser Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Tyr
          115          120          125

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
          130          135          140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
          145          150          155          160

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
          180          185          190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
          195          200          205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
          210          215          220

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
          225          230          235          240

```

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

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 723

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 35

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg atccagtgc 60  
 gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 120  
 atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catactgatg gaacgaccta tttgtattgg 180  
 tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctccctgatct atgaagtttc caaccggttc 240  
 tctggagtgcc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 300

```

agccgggtgg aggctgagga tgttgggatt tattactgca tgcaaaatat acagcttccg 360
tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720
tga 723

```

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 36

```

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Ile Pro
 1              5              10              15

Gly Ser Ser Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
          20              25              30

Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
          35              40              45

Leu Leu His Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
 50              55              60

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

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

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

Cys Met Gln Asn Ile Gln Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115              120              125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130              135              140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145              150              155              160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
          165              170              175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
          180              185              190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
          195              200              205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210              215              220

```

<210> 37  
 <211> 1416  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 37

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtagctc catcagtagt taccactgga actggatccg gcagcccgcc 180
gggaagggac tggagtggat tgggcgtatc tataccagtg ggagcaccaa ctacaacccc 240
tccctcaaga gtcgagtcac catgtcacta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
ctgagctctg tgaccgccgc ggacacggcc gtgtattact gtgcgagaga gggggtcagg 360
tattactatg cttcggggag ttattactac ggtctggacg tctggggcca agggaccacg 420
gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccacgtgtct tccccctggc gccctgctcc 480
aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct ctgaccageg gcgtgcacac cttcccagct 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac 660
ttcggcaccg agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720
aagacagttg agcgcaaag ttgtgtcgag tgcccaccgt gccagcacc acctgtggca 780
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaac 900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc 960
aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgccctggtc aaggcttcta cccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc 1260
atgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1416

```

<210> 38  
 <211> 471  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 38

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
  1                      5                      10                      15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
                20                      25                      30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile
      35                      40                      45

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

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

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Leu | Lys | Ser | Arg | Val | Thr | Met | Ser | Leu | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | 85  | 90  | 95  |
| Phe | Ser | Leu | Lys | Leu | Ser | Ser | Val | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | 100 | 105 | 110 |
| Tyr | Cys | Ala | Arg | Glu | Gly | Val | Arg | Tyr | Tyr | Tyr | Ala | Ser | Gly | Ser | Tyr | 115 | 120 | 125 |
| Tyr | Tyr | Gly | Leu | Asp | Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | 130 | 135 | 140 |
| Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | 145 | 150 | 155 |
| Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | 165 | 170 | 175 |
| Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | 180 | 185 | 190 |
| Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | 195 | 200 | 205 |
| Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Asn | Phe | Gly | Thr | Gln | 210 | 215 | 220 |
| Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | 225 | 230 | 235 |
| Lys | Thr | Val | Glu | Arg | Lys | Cys | Cys | Val | Glu | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | 245 | 250 | 255 |
| Pro | Pro | Val | Ala | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | 260 | 265 | 270 |
| Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | 275 | 280 | 285 |
| Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | 290 | 295 | 300 |
| Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | 305 | 310 | 315 |
| Asn | Ser | Thr | Phe | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Val | His | Gln | Asp | 325 | 330 | 335 |
| Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | 340 | 345 | 350 |
| Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | 355 | 360 | 365 |
| Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | 370 | 375 | 380 |

```

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385                      390                      395                      400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                      405                      410                      415

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                      420                      425                      430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
                      435                      440                      445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                      450                      455                      460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                      470

```

<210> 39  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 39

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctg atccagtggg 60
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtea cccctggaga gccggcctcc 120
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catggtaatg gatacaacta tttggattgg 180
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggc 240
tccggggctc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 300
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactctc 360
actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttagtga 720

```

<210> 40  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 40

```

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
  1                      5                      10                      15

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

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

Leu Leu His Gly Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
  50                      55                      60

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Gln | Leu | Leu | Ile | Tyr | Leu | Gly | Ser | Asn | Arg | Ala |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Thr | Leu | Lys | Ile | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Cys | Met | Gln | Ala | Leu | Gln | Thr | Leu | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Glu | Ile | Lys | Arg | Thr | Val | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Ser | Asp | Glu | Gln | Leu | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ala | Leu | Gln | Ser | Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser |  |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala |  |
|     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Asp | Tyr | Glu | Lys | His | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Leu | Ser | Ser | Pro | Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     |  |

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 1410

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 41

|             |            |            |             |            |            |     |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| atggactgga  | cctggagcat | ccttttcttg | gtggcagcag  | caacaggtgc | ccactcccag | 60  |
| gttcagctgg  | tgcagtctgg | agctgaggtg | aagaagcctg  | gggcctcagt | gaaggtctcc | 120 |
| tgcgaggctt  | ctggttacac | ctttaccagc | tatggtatcg  | actgggtgcg | acaggcccct | 180 |
| ggacaagggc  | ttgagtggat | gggatggatc | agcgtttaca  | gtggtaacac | aaactatgca | 240 |
| cagaagctcc  | agggcagagt | caccatgtcc | acagacacat  | ccacgagcac | agcctacatg | 300 |
| gagctgagga  | gcctgagatc | tgacgacacg | gccgtgtatt  | actgtgcgag | agagggtagc | 360 |
| agctcgtccg  | gagactacta | ctacggtatg | gacgtctggg  | gccaagggac | cacggtcacc | 420 |
| gtctcctcag  | cctccaccaa | gggcccatcg | gtcttccccc  | tggcgccctg | ctccaggagc | 480 |
| acctccgaga  | gcacagcggc | cctgggctgc | ctgggtcaagg | actacttccc | cgaaccggtg | 540 |
| acggtgtcgt  | ggaactcagg | cgctctgacc | agcggcgtgc  | acaccttccc | agctgtccta | 600 |
| cagtccctcag | gactctactc | cctcagcagc | gtggtgaccg  | tgccctccag | caacttcggc | 660 |
| accagacct   | acacctgcaa | cgtagatcac | aagcccagca  | acaccaaggt | ggacaagaca | 720 |
| gttgagcgca  | aatgttgtgt | cgagtgccca | ccgtgcccag  | caccacctgt | ggcaggaccg | 780 |
| tcagtcttcc  | tcttcccccc | aaaacccaag | gacaccctca  | tgatctcccg | gacccctgag | 840 |
| gtcacgtgcg  | tggtggtgga | cgtgagccac | gaagaccccg  | aggtccagtt | caactggtac | 900 |
| gtggacggcg  | tggaggtgca | taatgccaag | acaaagccac  | gggaggagca | gttcaacagc | 960 |



```

acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccggt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccc a ttgagaaaac catctccaaa 1080
accaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga                                     1410

```

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 469

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 42

```

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

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20             25             30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35             40             45

Thr Ser Tyr Gly Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50             55             60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Val Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala
 65             70             75             80

Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Thr Asp Thr Ser Thr Ser
          85             90             95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ser Ser Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Tyr
          115            120            125

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
          130            135            140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
          145            150            155            160

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
          180            185            190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
          195            200            205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
          210            215            220

```

```

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
225                               230                               235                               240

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
                               245                               250                               255

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                               260                               265                               270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
                               275                               280                               285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
                               290                               295                               300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
305                               310                               315                               320

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
                               325                               330                               335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
                               340                               345                               350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                               355                               360                               365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
                               370                               375                               380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385                               390                               395                               400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                               405                               410                               415

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                               420                               425                               430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
                               435                               440                               445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
                               450                               455                               460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

```

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 723

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 43

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg atccagtgcg 60

```

gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 120
atctcctgca agtctaataca gagcctcctg tatagtgatg gaaagaccta tttgttttgg 180
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccgattc 240
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 300
agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acagcttccg 360
tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720
tga 723

```

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 44

```

Gly Ser Ser Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
          20                      25                      30

Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Asn Gln Ser
          35                      40                      45

Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys
          50                      55                      60

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

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

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

Cys Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
          115                     120                     125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
          130                     135                     140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
          145                     150                     155                     160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
          165                     170                     175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
          180                     185                     190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys

```

- 270 -

```
<210> 45
<211> 1389
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

|            |            |            |            |            |             |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| atggagtttg | ggctgagctg | ggttttcctc | gttgctcttt | taagagtggt | ccagtgtcag  | 60   |
| gtgcagctgg | tggagtctgg | gggaggcgtg | gtccagcctg | ggaggtccct | gagactctcc  | 120  |
| tgtgcagcgt | ctggattcac | cttcagtagc | tatggcatgc | actgggtccg | ccaggctcca  | 180  |
| ggcaaggggc | tggagtgggt | ggcagttata | tggatatgat | gaagtaatga | atactatgca  | 240  |
| gactccgtga | agggccgatt | caccatctcc | agagacaatt | ccaagaacac | gctgtatctg  | 300  |
| caaatgaaca | gcctgagagc | cgaggacacg | gctgtgtatt | actgtgcgag | ggggggcgta  | 360  |
| cactttgect | actggggcca | gggaacctcg | gtcacctgtc | cctcagcttc | caccaagggc  | 420  |
| ccatccgtct | tccccctggc | gcectgctcc | aggagcacct | ccgagagcac | agccgcccgt  | 480  |
| ggctgcctgg | tcaaggacta | cttccccgaa | ccggtgacgg | tctcgtggaa | ctcaggcgcc  | 540  |
| ctgaccagcg | gcgtgcacac | cttccccggt | gtcctacagt | cctcaggact | ctactccctc  | 600  |
| agcagcgtgg | tgaccgtgcc | ctccagcagc | ttgggcacga | agacctacac | ctgcaacgta  | 660  |
| gatcacaagc | ccagcaacac | caaggtggac | aagagagttg | agtccaaata | tggcccccca  | 720  |
| tgcccatcat | gcccagcacc | tgagttcctg | gggggaccat | cagtcttcc  | gttcccccca  | 780  |
| aaacccaagg | acactctcat | gatctcccgg | acctctgagg | tcacgtgcgt | ggtgggtggac | 840  |
| gtgagccagg | aagaccccga | ggtccagttc | aactggtacg | tggatggcgt | ggaggtgcat  | 900  |
| aatgccaaga | caaaagccgg | ggaggagcag | ttcaacagca | cgtaccgtgt | ggtcagcgtc  | 960  |
| ctcaccgctc | tgcaccagga | ctggctgaac | ggcaaggagt | ccaagtgcga | ggtctccaac  | 1020 |
| aaaggcctcc | cgtcctccat | cgagaaaacc | atctccaaag | ccaaagggca | gccccgagag  | 1080 |
| ccacaggtgt | acaccctgcc | cccattccag | gaggagatga | ccaagaacca | ggtcagcctg  | 1140 |
| acctgcctgg | tcaaaggctt | ctaccccagc | gacatcgccg | tggagtggga | gagcaatggg  | 1200 |
| cagccggaga | acaactacaa | gaccacgcct | cccgtgctgg | actccgacgg | ctccttcttc  | 1260 |
| ctctacagca | ggctaaccgt | ggacaagagc | aggtggcagg | aggggaatgt | cttctcatgc  | 1320 |
| tccgtgatgc | atgaggctct | gcacaaccac | tacacacaga | agagcctctc | cctgtctctg  | 1380 |
| ggtaaatga  |            |            |            |            |             | 1380 |

```
<210> 46
<211> 462
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly  
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
20 25 30

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

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

| 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Trp | Val | Ala | Val | Ile | Trp | Tyr | Asp | Gly | Ser | Asn | Glu | Tyr | Tyr | Ala |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Ala | Tyr | His | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Cys | Pro | Ser | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys         |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |

<210> 47  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 47

```

atggacatga ggggccctgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct ctcaagtcgca 60
gggtgccagat gtgacatcca gatgaccag tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga 120
gacagagtca ccatcacttg ccaggcgagt caggacatta gcaactattt aaattgggat 180
cagcagaaac cagggaaagc ccctaagctc ctgatctacg atgcatccaa tttggaaaca 240
gggggtcccat caaggttcag tggaagtgga tctgggacag attttacttt caccatcagc 300
agcctgcagc ctgaagatat tgcaacatat tcctgtcaac actctgataa tctctcgatc 360
accttcggcc aggggacacg actggagatt aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420
atcttcccgcatctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
aataacttct accccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttagtga 720

```

<210> 48  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 48

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp |
| 1 5 10 15                                                       |
| Leu Ser Val Ala Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro |
| 20 25 30                                                        |
| Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln |
| 35 40 45                                                        |
| Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  |
| Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Ser Cys |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 |
| Gln His Ser Asp Asn Leu Ser Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 |
| Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 |
| Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu |     |     |
|                                                                 | 145 | 150 |
| Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 |
| Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 |
| Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 |
| Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 |
| Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys         |     |     |
|                                                                 | 225 | 230 |
|                                                                 |     | 235 |

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 681

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Macaca fascicularis

&lt;400&gt; 49

```

atggatcggg gacctggccct cctgctggcg gggcttcttg ggctcctcca gccgggctgc 60
ggccagtcct tccaggtgaa gcccctgcag gtggagcccc cggagccggt ggtggccgtg 120
gccctgggag cctctcgcca gctcacctgc cgcctggact gcgcggacgg cggggccacg 180
gtgcagtggc ggggcctgga caccagcctg ggcgcggtgc agtcggacgc gggccgcagc 240
gtcctcaccg tgcgcaacgc ctgctgtgct ggcgcgggga cccgtgtgtg cgtgggctcc 300
tgcgggggcc gcaccttcca gcacaccgtg cggctccttg tgtacgcctt cccggaccag 360
ctgaccatct ccccggcagc cctggtgect ggtgaccgag aggtggcctg tacggctcac 420
aaagtcaagc ctgtggacce caatgcgctc tccttctccc tgctcctggg ggaccaggaa 480
ctggaggggg cccaggtctt gggcccgagg gtggaggagg aggaggagcc ccaggaggag 540
gaggacgtgc tgttcagggt gacagagcgc tggcggtgct cgaccctggc aaccctgtgc 600
ctgcccgcgc tctactgcca ggccacgatg aggctgcctg gcttggagct cagccaccgc 660
caggccatcc cggctctgca c

```

&lt;210&gt; 50

PE2177537

- 274 -

<211> 227

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 50

```
Met Asp Arg Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Leu
 1              5              10              15

Gln Pro Gly Cys Gly Gln Ser Leu Gln Val Lys Pro Leu Gln Val Glu
      20              25              30

Pro Pro Glu Pro Val Val Ala Val Ala Leu Gly Ala Ser Arg Gln Leu
      35              40              45

Thr Cys Arg Leu Asp Cys Ala Asp Gly Gly Ala Thr Val Gln Trp Arg
 50              55              60

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

Val Leu Thr Val Arg Asn Ala Ser Leu Ser Ala Ala Gly Thr Arg Val
      85              90              95

Cys Val Gly Ser Cys Gly Gly Arg Thr Phe Gln His Thr Val Arg Leu
      100              105              110

Leu Val Tyr Ala Phe Pro Asp Gln Leu Thr Ile Ser Pro Ala Ala Leu
 115              120              125

Val Pro Gly Asp Pro Glu Val Ala Cys Thr Ala His Lys Val Thr Pro
 130              135              140

Val Asp Pro Asn Ala Leu Ser Phe Ser Leu Leu Leu Gly Asp Gln Glu
 145              150              155              160

Leu Glu Gly Ala Gln Ala Leu Gly Pro Glu Val Glu Glu Glu Glu Glu
      165              170              175

Pro Gln Glu Glu Glu Asp Val Leu Phe Arg Val Thr Glu Arg Trp Arg
      180              185              190

Leu Pro Thr Leu Ala Thr Pro Val Leu Pro Ala Leu Tyr Cys Gln Ala
 195              200              205

Thr Met Arg Leu Pro Gly Leu Glu Leu Ser His Arg Gln Ala Ile Pro
 210              215              220

Val Leu His
225
```

<210> 51

<211> 1398

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 51



```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc gatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcaattata tggatatgat gaagtaataa atattatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtatatt actgtgcgag agatcccggc 360
tactattacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcttcc 420
accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgctcta gaagcacctc cgagagcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 660
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agacagttga gcgcaaagt 720
tgtgtcgagt gccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 780
cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgctggtg 840
gtggacgtga gccacgaaga ccccaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 960
agcgtcctca ccgttggtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1080
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140
agcctgacct gcctggtcaa aggttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctcca tgctggactc cgacggctcc 1260
ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
tctccgggta aatgatag                                     1398

```

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 464

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 52

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1              5              10              15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
          20              25              30

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

Ser Ser Asp Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
          50              55              60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
          115             120             125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

```

| 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Val | Pro | Ser | Ser | Asn | Phe | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Thr | Val | Glu | Arg | Lys | Cys |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Cys | Val | Glu | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Pro | Val | Ala | Gly | Pro | Ser |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Phe | Arg | Val | Val |     |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |
| Ser | Val | Leu | Thr | Val | Val | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Ile | Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Met | Leu | Asp |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala |

435 440 445  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 53  
 <211> 705  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 53

```

atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcttc caggggtgaa 60
attgtgctga ctcagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaagagaa agtcaccatc 120
acctgccggg ccagtcagag aattggtagt agcttacct ggtaccagca gaaaccagat 180
cagtctccaa aactcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
ttcagtgcca gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa 300
gatgctgcaa cttattactg tcatcagagt ggtcgtttac cgctcacttt cggcggaggg 360
accaaggtgg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcactct cccgccatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agtga 705

```

<210> 54  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 54

```

Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
  1 5 10 15

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

Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile
      35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
      50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
      85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Gly Arg
      100 105 110

Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

```

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys                             |     |     |
| 225                                                             | 230 |     |

<210> 55  
 <211> 1410  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 55

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttctctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccc gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccagggtcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcaaataatg gaaataataa atactatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaaaaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgcgcgc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatagtacg 360
gcgataacct actactacta cggaatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 420
tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc tccccctgg cgccctgtc tagaagcacc 480
tccgagagca cagcgccct gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgctctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa ctctggcacc 660
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt 720
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccacgc tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 780
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccagag tccagttcaa ctggtacgtg 900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 960
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020
aagtgaagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc 1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1200
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacacctcc catgctggac 1260
tccgacggct cttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
agcctctccc tgtctccggg taaatgatag

```

<210> 56

PE2177537

- 279 -

<211> 468

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1           5           10           15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
          20           25           30

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

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50           55           60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Thr Ala Ile Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
          115          120          125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
          130          135          140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
          145          150          155          160

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
          180          185          190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
          195          200          205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
          210          215          220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
          225          230          235          240

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
          245          250          255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
          260          265          270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

```

|                                                                    |     |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 275                                                                | 280 | 285 |
| His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu    |     |     |
| 290                                                                | 295 | 300 |
| Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr    |     |     |
| 305                                                                | 310 | 315 |
| Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn .. |     |     |
| 325                                                                | 330 | 335 |
| Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro    |     |     |
| 340                                                                | 345 | 350 |
| Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln    |     |     |
| 355                                                                | 360 | 365 |
| Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val    |     |     |
| 370                                                                | 375 | 380 |
| Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val    |     |     |
| 385                                                                | 390 | 395 |
| Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro    |     |     |
| 405                                                                | 410 | 415 |
| Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr    |     |     |
| 420                                                                | 425 | 430 |
| Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val    |     |     |
| 435                                                                | 440 | 445 |
| Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu    |     |     |
| 450                                                                | 455 | 460 |
| Ser Pro Gly Lys                                                    |     |     |
| 465                                                                |     |     |

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 714

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 57

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt cggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagt attagtagct atttaaattg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgcat tatgctgcat ccggtttgaa gctggtgggtc 240
ccatcacggg tcagtggtag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagttctctg 300
caacctgagg attttgcaac ttactactgt caccagagtt acagtctccc attcactttc 360
ggccctggga ccaaagtga tatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtga 714

```

<210> 58  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 58

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1           5           10           15

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

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
          35           40           45

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Gly Leu Lys Arg Gly Val
 65           70           75           80

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
          100          105          110

Ser Tyr Ser Leu Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
          115          120          125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          130          135          140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
          145          150          155          160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
          165          170          175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          180          185          190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          195          200          205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          210          215          220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          225          230          235

```

<210> 59  
 <211> 1413  
 <212> DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 59

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtgactc catcagtagt aactattgga gctggatccg gcagcccggc 180
gggaaggagc tggagtggat tgggcgtatc tataccagtg ggggcaccaa ctccaacccc 240
tccctcaggg gtcgagtcac catgtcagta gacacgtcca agaaccagtt ctctctgaaa 300
ctgagttctg tgaccgcccgc ggacacggcc gtgtattact gtgcgagaga tcgtattact 360
ataattcggg gacttattcc atccttcttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 420
gtctcctcag cttccaccaa gggcccattc gtcttcccc tggcgccctg ctctagaagc 480
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc 660
acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaca 720
gttgagcgca aatgttgtgt cgagtggcca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccttgag 840
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 1080
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggaggagatg 1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaagget tctaccccag cgacatcgcc 1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata tag 1413

```

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 469

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 60

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1             5             10             15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20             25             30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile
35             40             45

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

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

Ser Leu Arg Gly Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85             90             95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100            105            110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ile Thr Ile Ile Arg Gly Leu Ile Pro Ser

```



| 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala |
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Asn | Phe | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr |
| 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Thr |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Val | Glu | Arg | Lys | Cys | Cys | Val | Glu | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Pro |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Val | Ala | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val |
| 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Thr | Phe | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Val | His | Gln | Asp | Trp | Leu |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ala |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln |
| 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Pro | Pro | Met | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu |

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

<210> 61  
 <211> 729  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 61

```

atggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctgg tgcctacggg 60
gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 120
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 180
tggtaccaac agaaaccagg acagcctcct aaattgctca ttactgggc atctatacgg 240
gaatatgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttatttct gtcaacaata ttatagtatt 360
cctcccccca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacgaactgt ggctgcacca 420
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttggtg 480
tgctgtctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgggaagg ggataacgcc 540
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 600
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 660
tgcgaaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag 720
tgtagtga                                     729
  
```

<210> 62  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 62

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

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
 130 135 140  
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
 145 150 155 160  
 Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
 165 170 175  
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
 180 185 190  
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 195 200 205  
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr  
 210 215 220  
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu  
 225 230 235 240

Cys

<210> 63  
 <211> 1419  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 63

atggaactgg ggctccgctg ggttttcctt gttgctatatt tagaagggtg ccagtgtgag 60  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcctg gtcaagcctg ggggggtccct gagactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatagcatga actgggtccg ccaggctcca 180  
 ggggaaggggc tggagtgggt ctcattccatt agtagtagta gtagttacat atactacgca 240  
 gactcagtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300  
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agatgggtat 360  
 agcagtggct ggtcctacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 420  
 gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc ccatccgtct tccccctggc gccctgctct 480  
 agaagcacct ccgagagcac agcgccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540  
 ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct 600  
 gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac 660  
 ttcggcacc cagacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720  
 aagacagttg agcgcaaag ttgtgtcgag tgcccaccgt gccagacacc acctgtggca 780  
 ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 840  
 cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaac 900  
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc 960  
 aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc 1020  
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa ggccctccag ccccatcgaa gaaaaccatc 1080  
 tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgaggag 1140  
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgccctggta aaggcttcta cccagcgac 1200

```

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca actacaagac cacacctccc 1260
atgctggact ccgacggctc cttcttcttc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcattgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatgatag 1419

```

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 471

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 64

```

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
  1             5             10             15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
          20             25             30

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala
  65             70             75             80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Tyr Tyr Tyr
          115            120            125

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

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
          145            150            155            160

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
          165            170            175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
          180            185            190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
          195            200            205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
          210            215            220

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
          225            230            235            240

```

Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
                             245                            250                            255  
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
                             260                            265                            270  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
                             275                            280                            285  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
                             290                            295                            300  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
                             305                            310                            315                            320  
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp  
                             325                            330                            335  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
                             340                            345                            350  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg  
                             355                            360                            365  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
                             370                            375                            380  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
                             385                            390                            395                            400  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
                             405                            410                            415  
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
                             420                            425                            430  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
                             435                            440                            445  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
                             450                            455                            460  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                             465                            470

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 723

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 65

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg atccagtgc 60  
 gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca ctctggaca gccggcctcc 120  
 atctcctgca agtctagtca gagcctcctg cttagtgatg gaaagaccta tttgaattgg 180  
 tacctgcaga agcccggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 240  
 tctggagtgc cagacaggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 300

```

agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttatg 360
tgcagttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720
tga 723

```

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 66

```

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Ile Pro
  1             5             10             15

Gly Ser Ser Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
          20             25             30

Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
          35             40             45

Leu Leu Leu Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys
  50             55             60

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

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

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

Cys Met Gln Ser Ile Gln Leu Met Ser Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys
          115             120             125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
          130             135             140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
          145             150             155             160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
          165             170             175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
          180             185             190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
          195             200             205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
          210             215             220

```

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 67  
 <211> 723  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 67

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg atccagtgcg 60
gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 120
atctcctgca agtctagtca gagcctcctg tatagtgatg gaaagaccta tttgttttgg 180
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccgattc 240
tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 300
agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttccg 360
tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcttgcgaa 660
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720
tga 723

```

<210> 68  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 68

```

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Ile Pro
  1 5 10 15

Gly Ser Ser Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

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

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

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

Cys Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

```

|                                                                 |  |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|--|-----|--|-----|
| 130                                                             |  | 135 |  | 140 |
| Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu |  |     |  |     |
| 145                                                             |  | 150 |  | 155 |
| Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 165 |  | 170 |
| Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 180 |  | 185 |
| Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 195 |  | 200 |
| Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 210 |  | 215 |
| Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys     |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 225 |  | 230 |
|                                                                 |  |     |  | 235 |

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descrição da sequência artificial: péptido sintético

&lt;400&gt; 69

|                                                         |
|---------------------------------------------------------|
| Ser Ser Gln Ser Leu Leu Gln Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu |
| 1 5 10                                                  |

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

&lt;400&gt; 70

tatctaagct tctagactcg agcgccacca tggactggac ctggagcatc ctt 53

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética



<400> 71

tatctaagct tctagactcg agcgccacca tggagtttgg gctgagctgg att 53

<210> 72

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 72

tatctaagct tctagactcg agcgccacca tggaactggg gctccgctgg gtt 53

<210> 73

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 73

tatctaagct tctagactcg agcgccacca tggagtttgg gctgagctgg ctt 53

<210> 74

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 74

tatctaagct tctagactcg agcgccacca tggagtttgg gctgagctgg gtt 53

<210> 75

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 75

tatctaagct tctagactcg agcgccacca tggagtttgg gctgagctgg gtt 53

<210> 76

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 76

tatctaagct tctagactcg agcgccacca tgaaacacct gtggttcttc ctc 53

<210> 77

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 77

tatctaagct tctagaccg ggcgccacca tgaggctccc tgctcagctc ctg 53

<210> 78

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 78

tatctaagct tctagaccg ggcgccacca tgttgccatc acaactcatt ggg 53

<210> 79

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 79

tatctaagct tctagaccg ggcgccacca tgggtgttgca gaccaggtc ttc 53

<210> 80

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 80

tatctaagct tctagaccg ggcgccacca tggacatgag ggtccccgct cag 53

<210> 81

<211> 53

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 81

tatctaagct tctagaccg ggcgccacca tggacatgag ggtccctgct cag 53

<210> 82

<211> 44

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 82

ttctctgatc agaattccta tcatttaccc ggagacaggg agag 44

<210> 83

<211> 43

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 83

ttctttgatc agaattctca ctaacactct cccctgttga agc 43

<210> 84

<211> 44

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 84

ttctctgatc agaattccta tcatttaccc agagacaggg agag 44

<210> 85  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 85  
ggatctg gga cagatttcac cctcaccatc aatagcctgg aagc 44

<210> 86  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 86  
gcttccaggc tattgatggt gagggtgaaa tctgtcccag atcc 44

<210> 87  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 87  
gcagcgtctg gattcacctt cagtagc 27

<210> 88  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 88  
gctactgaag gtgaatccag acgctgc 27

<210> 89  
<211> 24  
<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 89

cggaggtgct tctagagcag ggcg 24

<210> 90

<211> 47

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 90

gcaagtcaga gtattagtag ctatttaaatt tggtatcagc agaaacc 47

<210> 91

<211> 47

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 91

ggtttctgct gataccaatt taaatagcta ctaatactct gacttgc 47

<210> 92

<211> 48

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 92

ccatcagttc tctgcaacct gaggattttg caacttacta ctgtcacc 48

<210> 93

<211> 48

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 93

ggtgacagta gtaagttgca aaatcctcag gttgcagaga actgatgg 48

<210> 94

<211> 31

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 94

gcaaataaac agcctgcgcg ctgaggacac g 31

<210> 95

<211> 31

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 95

cgtgtcctca gcgcgcaggc tgttcatttg c 31

<210> 96

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 96

caataagaac tacttagctt ggtaccaaca gaaaccagga cagcc 45

<210> 97

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 97

ggctgtcctg gtttctgttg gtaccaagct aagtagttct tattg 45

<210> 98  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 98  
ccctcagggg tcgagtcacc atgtcagtag acacgtccaa gaacc 45

<210> 99  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 99  
ggttccttgga cgtgtctact gacatggtga ctcgaccct gaggg 45

<210> 100  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 100  
attctagagc agggcgccag g 21

<210> 101  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 101  
ccatctcctg caagtctagt cagagcctcc 30

<210> 102  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 102

ggaggctctg actagacttg caggagatgg 30

<210> 103

<211> 47

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 103

ggtttattac tgcatgcaaa gtatacagct tatgtccagt tttggcc 47

<210> 104

<211> 47

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 104

ggcctaaaact ggacataagc tgtatacttt gcatgcagta ataaacc 47

<210> 105

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 105

cctgcaagtc tagtcagagc ctcc 24

<210> 106

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 106



- 299 -

```
<210> 107
<211> 543
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

|          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Met<br>1 | Asp | Phe | Gly | Leu | Ala | Leu | Leu | Leu | Ala | Gly | Leu | Leu | Gly | Leu | Leu | 15 |
| Leu      | Gly | Gln | Ser | Leu | Gln | Val | Lys | Pro | Leu | Gln | Val | Glu | Pro | Pro | Glu |    |
|          |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |    |
| Pro      | Val | Val | Ala | Val | Ala | Leu | Gly | Ala | Ser | Arg | Gln | Leu | Thr | Cys | Arg |    |
|          |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |    |
| Leu      | Ala | Cys | Ala | Asp | Arg | Gly | Ala | Ser | Val | Gln | Trp | Arg | Gly | Leu | Asp |    |
|          | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |    |
| Thr      | Ser | Leu | Gly | Ala | Val | Gln | Ser | Asp | Thr | Gly | Arg | Ser | Val | Leu | Thr |    |
| 65       |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |    |
| Val      | Arg | Asn | Ala | Ser | Leu | Ser | Ala | Ala | Gly | Thr | Arg | Val | Cys | Val | Gly |    |
|          |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |    |
| Ser      | Cys | Gly | Gly | Arg | Thr | Phe | Gln | His | Thr | Val | Gln | Leu | Leu | Val | Tyr |    |
|          |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |    |
| Ala      | Phe | Pro | Asp | Gln | Leu | Thr | Val | Ser | Pro | Ala | Ala | Leu | Val | Pro | Gly |    |
|          |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |    |
| Asp      | Pro | Glu | Val | Ala | Cys | Thr | Ala | His | Lys | Val | Thr | Pro | Val | Asp | Pro |    |
|          | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |    |
| Asn      | Ala | Leu | Ser | Phe | Ser | Leu | Leu | Val | Gly | Gly | Gln | Glu | Leu | Glu | Gly |    |
| 145      |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |    |
| Ala      | Gln | Ala | Leu | Gly | Pro | Glu | Val | Gln | Glu | Glu | Glu | Glu | Glu | Pro | Gln |    |
|          |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |    |
| Gly      | Asp | Glu | Asp | Val | Leu | Phe | Arg | Val | Thr | Glu | Arg | Trp | Arg | Leu | Pro |    |
|          |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |    |
| Pro      | Leu | Gly | Thr | Pro | Val | Pro | Pro | Ala | Leu | Tyr | Cys | Gln | Ala | Thr | Met |    |
|          |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |    |
| Arg      | Leu | Pro | Gly | Leu | Glu | Leu | Ser | His | Arg | Gln | Ala | Ile | Pro | Val | Leu |    |
|          | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |    |
| His      | Ser | Pro | Thr | Ser | Pro | Glu | Pro | Pro | Asp | Thr | Thr | Ser | Pro | Glu | Ser |    |
| 225      |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |    |
| Pro      | Asp | Thr | Thr | Ser | Pro | Glu | Ser | Pro | Asp | Thr | Thr | Ser | Gln | Glu | Pro |    |
|          |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |    |

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| $\langle 210 \rangle$ | 108 |
| $\langle 211 \rangle$ | 23  |

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 108

caggtgcagc tggagcagtc tgg 23

<210> 109

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 109

gctgagggag tagagtcctg agga 24

<210> 110

<211> 28

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 110

gctgagggag tagagtcctg aggactgt 28

<210> 111

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 111

agcatggatc ggggcctggc c 21

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: sequência iniciadora sintética

<400> 112  
gtgcaggacc gggatggcct g 21

<210> 113  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 113

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

<210> 114  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 114

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                     85                                    90                                    95  
 Ala Ala Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
                                     100                                    105                                    110.  
 Val Ser Ser Ala  
                                     115

<210> 115  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 115

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

<210> 116  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 116

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
   1                                    5                                    10                                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                                     20                                    25                                    30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                                     35                                    40                                    45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Thr Val Val Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120

<210> 117  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 117

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

<210> 118  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 118

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

```

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

```

<210> 119  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

```

<400> 119
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
  1                5                10                15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20                25                30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                40                45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65                70                75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95
Ala Arg Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
      100                105                110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
      115                120                125

```

<210> 120  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 120

```

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 Ser Tyr
          20           25           30

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

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

Gln 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 Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
          100           105           110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
          115           120

```

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 121

```

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
          50           55           60

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
          65           70           75           80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85           90           95

Arg Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
          100           105           110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
          115           120

```



PE2177537

- 307 -

<210> 122  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 122

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

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

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

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

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

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

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

<210> 123  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 123

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Gln Ser
          20              25              30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
          85              90              95

Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
          100              105              110
```

PE2177537

- 308 -

<210> 124  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 124

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

<210> 125  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 125

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

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

<210> 126

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

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

<210> 127

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

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

100

105

110

Lys Arg

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 128

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

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 129

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

Ile Gln Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

<210> 130  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 130

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

Arg

<210> 131  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 131

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
                             85                            90                            95

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

<210> 132  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 132

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
                             20                            25                            30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Ile Thr  
                             85                            90                            95

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

<210> 133  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 133

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 Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
                             20                            25                            30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Phe

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Phe | Leu | Leu | Arg | Ser | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ala | Arg | Glu | Gly | Ser | Ser | Ser | Ser | Gly | Asp | Tyr | Tyr | Tyr | Gly | Met | Asp |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala |     |     |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |

<210> 134  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Macaca fascicularis

<400> 134  
 Lys Pro Leu Gln Val Glu Pro Pro Glu Pro  
 1 5 10

<210> 135  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 135  
 Thr Phe Asn Asn Ser Ala Met Thr  
 1 5

<210> 136  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 136  
 Cys Lys Ser Asn Gln Ser Leu Leu Tyr  
 1 5

<210> 137  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 137  
 Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Thr Ile  
 1 5

<210> 138  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 138

Ala Ser Gln Asn Ile Ser Ser Tyr Leu  
1 5

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 139

Ser Ser Asn Asn Lys Thr Tyr Leu Ala  
1 5

&lt;210&gt; 140

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 140

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Thr Asn  
1 5

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 141

Ser Cys Asn Ser Ser Gln Ser Leu  
1 5

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 142

His Ser Asp Asn Leu Ser Ile Thr  
1 5

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 143

Leu Gln Ser Asn Gly Tyr Asn  
1 5

&lt;210&gt; 144

&lt;211&gt; 7



<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Leu Gln Ser Asn Gly Tyr Asn  
1 5

<210> 145

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

His Gly Asn Gly Tyr Asn Tyr  
1 5

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Leu Thr Ile Asn Gly Leu Glu Ala  
1 5

<210> 147

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: péptido sintético de ligação

<400> 147

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Lisboa, 23 de Novembro de 2011

## REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo monoclonal, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga especificamente a MAdCAM com um  $K_d$  de  $2,35 \times 10^{-11}M$ , ou inferior, medido por ressonância de plasmões de superfície e que inibe a ligação de MAdCAM humana a  $\alpha_4\beta_7^+$ , em que a cadeia pesada do anticorpo ou porção do mesmo de ligação ao antígeno compreende as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada e em que a cadeia leve do anticorpo ou a sua porção de ligação ao antígeno compreende as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve, do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

2. Um anticorpo monoclonal, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga especificamente a MAdCAM com um  $K_d$  de  $2,35 \times 10^{-11}M$ , ou inferior, medido por ressonância de plasmões de superfície e que inibe a ligação de MAdCAM humana a  $\alpha_4\beta_7^+$ , em que a cadeia pesada do anticorpo ou porção do mesmo de ligação ao antígeno compreende as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 em SEQ ID NO:34 e a cadeia leve do anticorpo ou a sua porção de ligação ao antígeno compreende as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 em SEQ ID NO:36.

3. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o

anticorpo ou porção compreende uma cadeia pesada que utiliza um gene VH 1-18 humano.

4. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo ou porção compreende uma cadeia leve que utiliza um gene V<sub>K</sub> A2 humano.

5. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma ou mais das sequências de aminoácidos FR1, FR2, FR3 e FR4 do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma N° de Acesso ECACC 03090909 (designação interna 7.16.6).

6. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 2, em que o referido anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma ou mais das sequências de aminoácidos FR1, FR2, FR3 e FR4 em SEQ ID NO:34 ou SEQ ID NO:36.

7. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1, em que a cadeia pesada e a cadeia leve compreendem as sequências de aminoácidos desde o começo da CDR1 até ao final da CDR3 da cadeia pesada e da cadeia leve, respectivamente, do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

8. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno, em que os domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve do anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada e da cadeia leve, respectivamente, do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

9. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 8 compreendendo as sequências de aminoácidos da cadeia pesada e leve do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

10. O anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 9, em que o anticorpo é o anticorpo monoclonal humano produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

11. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 8, compreendendo as sequências de aminoácidos da cadeia pesada e da cadeia leve do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6), em que está eliminada a lisina C-terminal da cadeia pesada.

12. Um anticorpo monoclonal ou sua porção de

ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 2, em que a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos desde o começo da CDR1 até ao final da CDR3 em SEQ ID NO:34 e a cadeia leve, compreende a sequência de aminoácidos desde o começo da CDR 1 até ao final da CDR3 em SEQ ID NO:36.

13. O anticorpo monoclonal ou sua porção de ligação ao antígeno, em que a cadeia pesada do anticorpo ou da porção de ligação ao antígeno do mesmo compreende a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada em SEQ ID NO:34 e a cadeia leve do anticorpo ou sua porção de ligação ao antígeno compreende a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve em SEQ ID NO:36.

14. Um anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 13 compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NOS:34 e 36 sem as sequências sinal.

15. Um anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 13 compreendendo as sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID NOS:34 e 36 sem as sequências sinal e em que a lisina C-terminal da cadeia pesada foi cortada.

16. Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores que é uma molécula de imunoglobulina G (IgG), de IgM, de IgE, de IgA ou de IgD, ou um anticorpo biespecífico.

17. Uma porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 que é um fragmento Fab, um fragmento  $F(ab')_2$ , um fragmento  $F_v$  ou um anticorpo de cadeia simples.

18. Uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

19. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18 compreendendo ainda um ou mais de outros agentes anti-inflamatórios ou imunomoduladores.

20. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 19, em que um ou mais de outros agentes anti-inflamatórios ou imunomoduladores são seleccionados do grupo consistindo em: corticosteróides, amino-salicilatos, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, FK506, IL-10, GM-CSF, rapamicina, agentes anti-TNF $\alpha$  e antagonistas de moléculas de fusão.

21. Uma vacina compreendendo o anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

22. A vacina de acordo com a reivindicação 21, em que a vacina é mucosal.

23. Um kit de diagnóstico compreendendo o anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

24. Uma linha celular de hibridoma que produz um anticorpo monoclonal humano que especificamente se liga à Molécula Mucosal Adressina de Adesão Celular (MAdCAM), em que o hibridoma é o hibridoma ECACC N° de Acesso 03090909 (designação interna 7.16.6).

25. Uma linha celular isolada que produz o anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

26. A linha celular de acordo com a reivindicação 25 que produz o anticorpo da reivindicação 9 ou 14.

27. Uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16.

28. Um vector compreendendo a molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 27.

29. Uma célula hospedeira compreendendo o vector de acordo com reivindicação 28 ou a molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 27.

30. Uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de ácido nucleico codificador da cadeia pesada ou porção de ligação ao antígeno da mesma e uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia leve ou porção de ligação ao antígeno da mesma, do anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

31. Um método para a produção de um anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a MAdCAM, compreendendo a célula hospedeira de acordo com a reivindicação 29 ou 30 ou a linha celular de acordo com a reivindicação 24 ou 25 em condições adequadas e recuperação do anticorpo ou da porção de ligação ao antígeno.

32. Um animal transgênico não humano ou planta transgênica compreendendo uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia pesada ou uma porção de ligação ao antígeno da mesma e uma molécula de ácido nucleico codificadora da cadeia leve ou de uma porção de ligação ao antígeno da mesma, de um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que são expressos os polipéptidos da cadeia pesada e da cadeia leve codificados pelas moléculas de ácido nucleico.

33. Um método de isolamento de um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a MAdCAM, compreendendo o passo de



isolamento do anticorpo a partir do animal transgénico não humano ou planta transgénica de acordo com a reivindicação 32.

34. Um anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o anticorpo ou porção inibe a ligação de MAdCAM a  $\alpha 4\beta 7$ , para usar no tratamento de doença inflamatória num indivíduo necessitado.

35. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio da reivindicação 34, em que a doença inflamatória é uma doença inflamatória do trato gastrointestinal.

36. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio da reivindicação 35, em que a doença inflamatória do trato gastrointestinal é seleccionada do grupo consistindo em doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença diverticular, gastrite, doença hepática, esclerose biliar primária e colangite esclerosante.

37. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antigénio da reivindicação 35, em que a doença inflamatória do trato gastrointestinal é doença inflamatória intestinal, doença de Crohn ou colite ulcerativa.

38. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno da reivindicação 34, em que a doença inflamatória é diabetes dependente de insulina ou doença de enxerto contra hospedeiro.

39. Um anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o anticorpo ou porção é marcado de forma detectável, para usar na detecção de inflamação num indivíduo.

40. Um anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17 para determinar se existe um aumento no nível de circulação de leucócitos que expressam  $\alpha_4\beta_7$  e assim detectar o efeito da administração de um anticorpo inibidor anti-MAdCAM, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, a um indivíduo.

41. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 40, em que os leucócitos são linfócitos.

42. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 40, em que o aumento no nível de leucócitos que expressam  $\alpha_4\beta_7$  é determinado por análise FACS.

43. Um anticorpo monoclonal ou porção de ligação

ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17 para usar como um medicamento.

44. Um método para o diagnóstico de um distúrbio caracterizado pela circulação de MAdCAM humana solúvel, compreendendo os passos de: (1) contacto de uma amostra biológica com o anticorpo monoclonal, ou porção de ligação ao antigénio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17 e (2) detecção da ligação do anticorpo ou porção a MAdCAM.

45. Um vector de acordo com a reivindicação 28, em que o vector compreende uma sequência de controlo da expressão operacionalmente ligada à molécula de ácido nucleico.

Lisboa, 23 de Novembro de 2011

# Figura 1

| Figure 1A                                                                                   | CDL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | CDL | CDL         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------|
| <p>Fig3-15 Product</p> <p>1.7.2 Heavy chain</p> <p>1.8.2 Heavy chain</p>                    | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> |     | <p>CDL3</p> |
| <p>Figure 1B</p> <p>Fig3-23 Product</p> <p>6.14.2 Heavy chain</p>                           | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p>                                                                                                                           |     |             |
| <p>Figure 1C</p> <p>Fig3-33 Product</p> <p>6.22.2 Heavy chain</p>                           | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p>                                                                                                                           |     |             |
| <p>Figure 1D</p> <p>Fig3-30 Product</p> <p>6.34.2 Heavy chain</p>                           | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p>                                                                                                                           |     |             |
| <p>Figure 1E</p> <p>Fig4-4 Product</p> <p>6.67.1 Heavy chain</p>                            | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p>                                                                                                                           |     |             |
| <p>Figure 1F</p> <p>Fig3-23 Product</p> <p>6.73.2 Heavy chain</p>                           | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p>                                                                                                                           |     |             |
| <p>Figure 1G</p> <p>Fig3-21 Product</p> <p>6.77.1 Heavy chain</p>                           | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p>                                                                                                                           |     |             |
| <p>Figure 1H</p> <p>Fig4-18 Product</p> <p>7.16.6 Heavy chain</p> <p>7.26.4 Heavy chain</p> | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p>                                                                                                                           |     |             |
| <p>Figure 1I</p> <p>Fig4-4 Product</p> <p>7.20.5 Heavy chain</p>                            | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p>                                                                                                                           |     |             |
| <p>Figure 1J</p> <p>Fig3-13 Product</p> <p>9.8.2 Heavy chain</p>                            | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPSHAMENVRQAPGKLEWVQRIKRTKGGTTDVAAPKRPITISDDSGNTLYIQMSISLSTSTAVYCTT...VA-DYWGQGLAVTVSSA</p>                                                                                                                           |     |             |

# Figure 1, cont

|                    | CDRL                                                                                                            | CDR2 | CDR3 |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|
| Figure 1K          |                                                                                                                 |      |      |
| A3 Product         | DIWNTQSPFLSLPTTPGSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR     |      |      |
| 1.7.2 Kappa chain  | DIWNTQSPFLSLPTTPGSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR     |      |      |
| 1.8.2 Kappa chain  | DIWNTQSPFLSLPTTPGSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR     |      |      |
| Figure 1L          |                                                                                                                 |      |      |
| O12 Product        | DIQNTQSPSSSLASVVDHVTITTCNAPSISSTVNTWYDQKPKAKPVLLPAAASLQSGVPSHPSGSGSTDTFTLTSSLSQPEDPATYVYCNQSYSTP--TFQGGTLEIKR   |      |      |
| 6.14.2 Kappa chain | DIQNTQSPSSSLASVVDHVTITTCNAPSISSTVNTWYDQKPKAKPVLLPAAASLQSGVPSHPSGSGSTDTFTLTSSLSQPEDPATYVYCNQSYSTP--TFQGGTLEIKR   |      |      |
| Figure 1M          |                                                                                                                 |      |      |
| A26 Product        | EVVLQSPSPFQSVTPKSEVTTTCNAPSISGSLNLTQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLTINELSRADNATYVYCNQSSSL--TFQGGTKVVEIKR      |      |      |
| 6.22.2 Kappa chain | EVVLQSPSPFQSVTPKSEVTTTCNAPSISGSLNLTQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLTINELSRADNATYVYCNQSSSL--TFQGGTKVVEIKR      |      |      |
| Figure 1N          |                                                                                                                 |      |      |
| O12 Product        | DIQNTQSPSSSLASVVDHVTITTCNAPSISSTVNTWYDQKPKAKPVLLPAAASLQSGVPSHPSGSGSTDTFTLTSSLSQPEDPATYVYCNQSYSTP--TFQGGTKVVDIKR |      |      |
| 6.34.2 Kappa chain | DIQNTQSPSSSLASVVDHVTITTCNAPSISSTVNTWYDQKPKAKPVLLPAAASLQSGVPSHPSGSGSTDTFTLTINELSRADNATYVYCNQSSSL--TFQGGTKVVDIKR  |      |      |
| Figure 1O          |                                                                                                                 |      |      |
| A3 Product         | DIWNTQSPFLSLAVELGKNTTCNAPSISGSLNLTQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLTSSLSQPEDPATYVYCNQSYSTP--TFQGGTKVVEIKR      |      |      |
| 6.67.1 Kappa chain | DIWNTQSPFLSLAVELGKNTTCNAPSISGSLNLTQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLTSSLSQPEDPATYVYCNQSYSTP--TFQGGTKVVEIKR      |      |      |
| Figure 1P          |                                                                                                                 |      |      |
| O12 Product        | DIQNTQSPSSSLASVVDHVTITTCNAPSISGSLNLTQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLTSSLSQPEDPATYVYCNQSYSTP--TFQGGTKVVDIKR    |      |      |
| 6.73.2 Kappa chain | DIQNTQSPSSSLASVVDHVTITTCNAPSISGSLNLTQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLTSSLSQPEDPATYVYCNQSYSTP--TFQGGTKVVDIKR    |      |      |
| Figure 1Q          |                                                                                                                 |      |      |
| A2 Product         | DIWNTQSPFLSLAVTTPQSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR    |      |      |
| 6.77.1 Kappa chain | DIWNTQSPFLSLAVTTPQSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR    |      |      |
| Figure 1R          |                                                                                                                 |      |      |
| A2 product         | DIWNTQSPFLSLAVTTPQSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR    |      |      |
| 7.16.4 Kappa chain | DIWNTQSPFLSLAVTTPQSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR    |      |      |
| 7.26.4 Kappa chain | DIWNTQSPFLSLAVTTPQSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR    |      |      |
| Figure 1S          |                                                                                                                 |      |      |
| A3 Product         | DIWNTQSPFLSLAVTTPQSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR    |      |      |
| 7.26.5 Kappa chain | DIWNTQSPFLSLAVTTPQSPASISCSQSQSLIQSGVNTLWTLQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLKLSRVKAEADVGVYCNALQTLTFQGGTLEIKR    |      |      |
| Figure 1T          |                                                                                                                 |      |      |
| O18 Product        | DIQNTQSPSSSLASVVDHVTITTCNAPSISGSLNLTQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLTSSLSQPEDPATYVYCNQSYSTP--TFQGGTLEIKR      |      |      |
| 9.8.2 Kappa chain  | DIQNTQSPSSSLASVVDHVTITTCNAPSISGSLNLTQKQSPQALLYLQSNRSLSCVDRPSGSGSTDTFTLTSSLSQPEDPATYVYCNQSYSTP--TFQGGTLEIKR      |      |      |

## Figura 2

## Figura 2A

```

1.7.2      --MRLPAQLLGILLMLWVS--GSSGDIYMTQSFLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLQS-NGY
1.8.2      --MRLPAQLLGILLMLWVS--GSSGDIYMTQSFLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLQS-NGY
7.20.5     --MRLPAQLLGILLMLWVS--GSSGDIYMTQSFLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLQS-NGY
7.16.6     --MRLPAQLLGILLMLWIP--GSSADIYMTQTFELSLSVTPGQFASISCKSSQSLLMT-DGT
7.26.4     --MRLPAQLLGILLMLWIP--GSSADIYMTQTFELSLSVTPGQFASISCKSNQSLLYP-DGK
6.77.1     --MRLPAQLLGILLMLWIP--GSSADIYMTQTFELSLSVTPGQFASISCKSSQSLLLS-DGK
6.67.1     --MVLQTVVFISLLWIS--GAYCDIYMTQSFPSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSHNK
6.34.2     MDMRVPAQLLGILLMLWLR--GARCDIQMTQSFSSLSASVGDVVTTCRASQNISSY----
6.73.2     MDMRVPAQLLGILLMLWLR--GARCDIQMTQSFSSLSASVGDVVTTCRASQNISSY----
6.14.2     MDMRVPAQLLGILLMLWLR--GARCDIQMTQSFSSLSASVGDVVTTCRASQNISSY----
9.8.2      MDMRVPAQLLGILLMLWLSVAGARCDIQMTQSFSSLSASVGDVVTTCRASQDISSY----
6.22.2     ---MLPSQLIGFILLWVF--ASRGEIVLTQSFDPQSVTPKSKVTITCRASQRISSS----

```

```

      1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

```

```

1.7.2      NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSENRAAGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQ
1.8.2      NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSENRAAGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQ
7.20.5     NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSENRAAGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQ
7.16.6     TYLWYLQKPGQSPQLLIYEVSNRPSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQ
7.26.4     TYLWYLQKPGQSPQLLIYEVSNRPSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQ
6.77.1     TYLWYLQKPGQSPQLLIYEVSNRPSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQ
6.67.1     TYLWYQQKPRQPKLLIYKASIRSYGVPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYTCQQ
6.34.2     --LHWYQQKPKKAPKLLIYAASGLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDVATYTCQQ
6.73.2     --LHWYQQKPKKAPKLLIYAASGLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDVATYTCQQ
6.14.2     --LHWYQQKPKKAPKLLIYFVSSLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDVATYTCQQ
9.8.2      --LHWYQQKPKKAPKLLIYDARSLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDVATYTCQQ
6.22.2     --LHWYQQKPKDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDVATYTCQQ

```

```

      * 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

```

```

1.7.2      ALQT---ITFGGQTKLEIKR
1.8.2      ALQT---ITFGGQTKLEIKR
7.20.5     ALQT---ITFGGQTKLEIKR
7.16.6     NIQLP--WTFGGQTKVEIKR
7.26.4     SIQLP--WTFGGQTKVEIKR
6.77.1     SIQLM--CSFGGQTKLEIKR
6.67.1     YYSIPP--ITFGGQTKVEIKR
6.34.2     SYSLP--FTFGGQTKVEIKR
6.73.2     SYSNFP--CSFGGQTKLEIKR
6.14.2     NYIIPP--ITFGGQTKLEIKR
9.8.2      SDNLS--ITFGGQTKLEIKR
6.22.2     SGRLP--ITFGGQTKVEIKR

```

```

      ** * 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

```

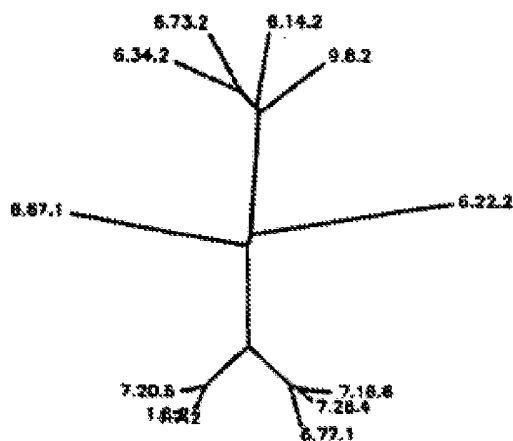


Figura 2B

```

7.16.6 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGTTFTSYGIDWVRQAPGGQGLEWMGNIS--VYSGNT
7.26.4 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGTTFTSYGIDWVRQAPGGQGLEWMGNIS--VYSGNT
1.7.2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASSGFTFTNAWMIWVRQAPGGKGLEWVGRIKRKTDGGTT
1.8.2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVGSGFTFTNAWMIWVRQAPGGKGLEWVGRIKRKTDGGTT
6.14.2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFNNSAMTWVRQAPGGKGLEWVSTTS--GSGOTT
6.73.2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPRSYAMNHWVRQAPGGKGLEWVSVIS--GSGOTT
6.77.1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSKHWVRQAPGGKGLEWVSVIS--SSSYI
6.22.2 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGHTFSSDGMMHWVRQAPGGKGLEWVAIIW--YDGSNK
6.34.2 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGGKGLEWVAIV--NDGDK
9.8.2 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGGKGLEWVAIV--YDGSNE
7.20.5 QVQLQESGGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSISSYHMMWIRQPAGEKLEWIGRIY---TSGST
6.67.1 QVQLQESGGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSNYWSWIRQPAGEKLEWIGRIY---TSGGT
:*** :** : :*, : : :* :** : : :* :* :*****: ..

7.16.6 NYAQKVGGRVTMTADTSTSTAYMQLSLRLSDDTAVYYCAREG--SS--SSGDYYYGMDEVWG
7.26.4 NYAQKLGGRVTMTDTSTSTAFFLRLSLRLSDDTAVYYCAREG--SS--SSGDYYYGMDEVWG
1.7.2 DYAAFPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGG-----VAEDY-----WG
1.8.2 DYAAFPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGG-----VAEDY-----WG
6.14.2 YYADSVKGRFTISRDSFKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARG--YSGTTPYKY-----WG
6.73.2 YYADSVKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKIA--VAGEGLYYYYG--MDVWG
6.77.1 YYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDG--YSSGNSYYYYYGMDEVWG
6.22.2 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD-----PGYXXG--MDVWG
6.34.2 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDS--TA--ITYYYYG--MDVWG
9.8.2 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG-----AYH--PAYWG
7.20.5 NYNPSLKSRYTMSLDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCAREGVRYYYASGSGYYYGLDEVWG
6.67.1 NSNPSLKSRYTILADTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARD--RITIIROLIPSPFTYWG
: :*,* : * : : :* : :*****: **

7.16.6 QGTVTVVSSA
7.26.4 QGTVTVVSSA
1.7.2 QGTVTVVSSA
1.8.2 QGTVTVVSSA
6.14.2 QGTVTVVSSA
6.73.2 QGTVTVVSSA
6.77.1 QGTVTVVSSA
6.22.2 QGTVTVVSSA
6.34.2 QGTVTVVSSA
9.8.2 QGTVTVVSSA
7.20.5 QGTVTVVSSA
6.67.1 QGTVTVVSSA
*** *****

```

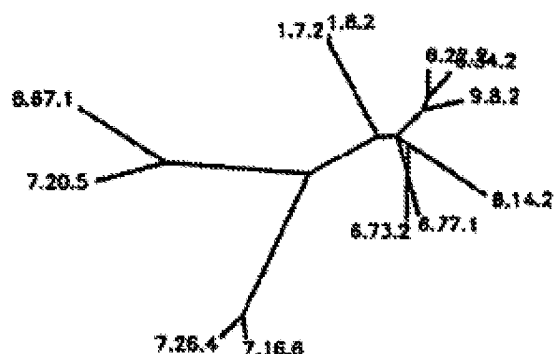


Figura 3

Domain 1

|              |                                                                |
|--------------|----------------------------------------------------------------|
| cyno MadCAM  | MDRGIAALLLAGLLGLIQPGCCQSLQVKPLQVEPFEPVVAVALGASRQLTCRLDCADGGAT  |
| human MadCAM | MDPGLAALLLAGLLGLLL---GQSLQVKPLQVEPFEPVVAVALGASRQLTCRLACADRGAS  |
|              | ** *****                                                       |
|              | *****                                                          |
|              | *****                                                          |
| cyno MadCAM  | VQWRGLDTSIGAVQSDAGRSVLTVRNASLSAAGTRVCVGS CGGRTFPQHTVLLVYAFEDQ  |
| human MadCAM | VQWRGLDTSIGAVQSDTGRSVLTVRNASLSAAGTRVCVGS CGGRTFPQHTVQLLVYAFEDQ |
|              | *****                                                          |

Domain 2

|              |                                                                |
|--------------|----------------------------------------------------------------|
| cyno MadCAM  | LTISPAAALVPGDFEVACTAHKVTVPVDFNALSPFLILGQCELEGAQALGPEVKEEES-PQE |
| human MadCAM | LTVSPAAALVPGDFEVACTAHKVTVPVDFNALSPFLILVGGQCELEGAQALGPEVQEEERPG |
|              | ** *****                                                       |
|              | *****                                                          |
|              | *****                                                          |
| cyno MadCAM  | HEVDLFRVTERKRLPPLGTVPVPPALYQATNQLPGLSLSHRQALFVLM               |
| human MadCAM | DHDVLFRTVERKRLPPLGTVPVPPALYQATNQLPGLSLSHRQALFVLM               |
|              | *****                                                          |



Figura 4

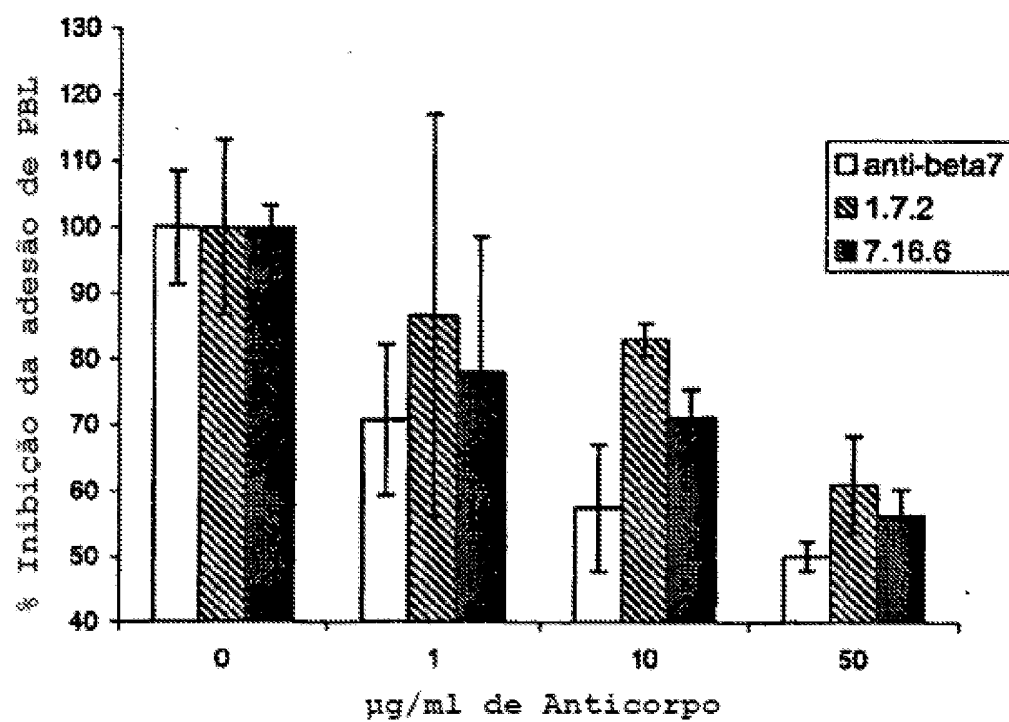


Figura 5

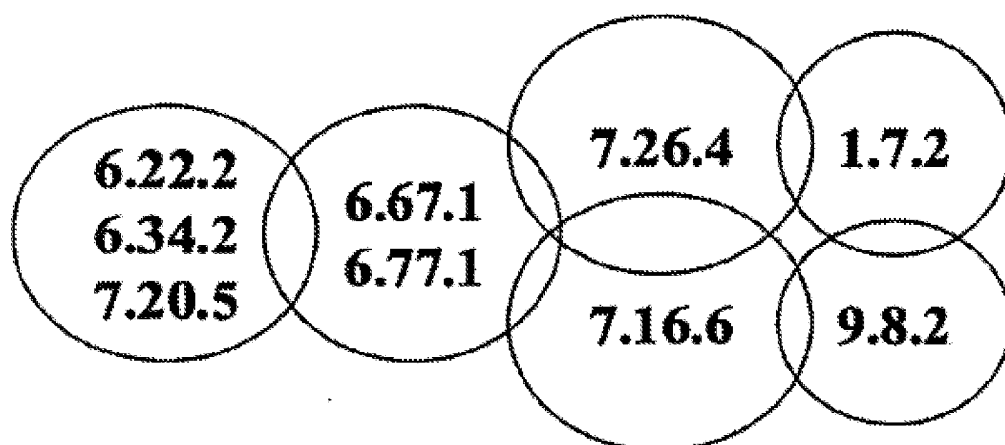


Figura 6

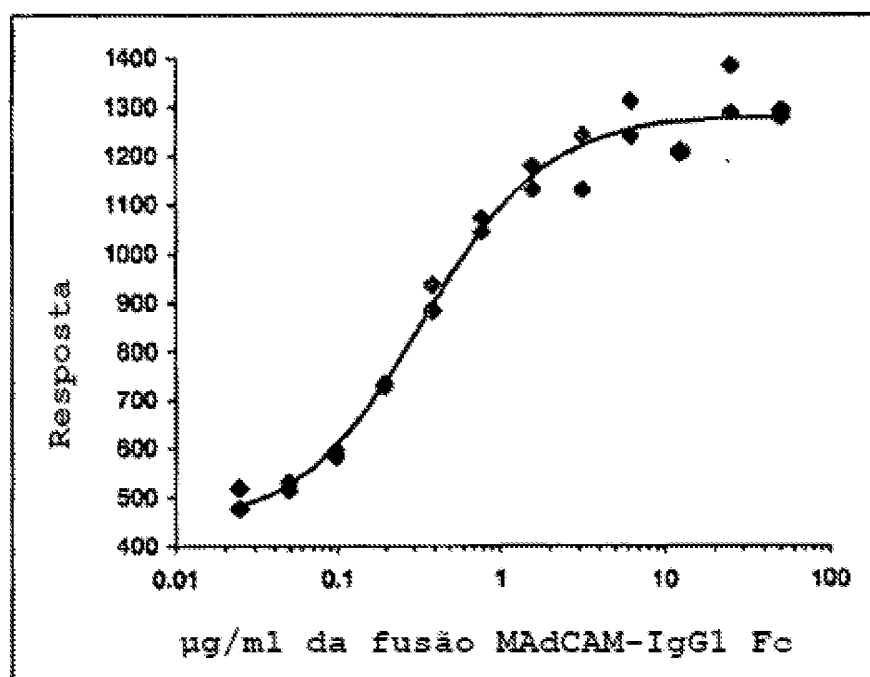


Figura 7

