

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0611220-0 A2**

(22) Data de Depósito: 25/05/2006
(43) Data da Publicação: 24/08/2010
(RPI 2068)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/28
A61P 35/00

(54) Título: **ANTICORPOS DIRECIONADOS PARA CD20 E USOS DOS MESMOS**

(30) Prioridade Unionista: 02/06/2005 US 60/686.992

(73) Titular(es): ASTRAZENECA AB

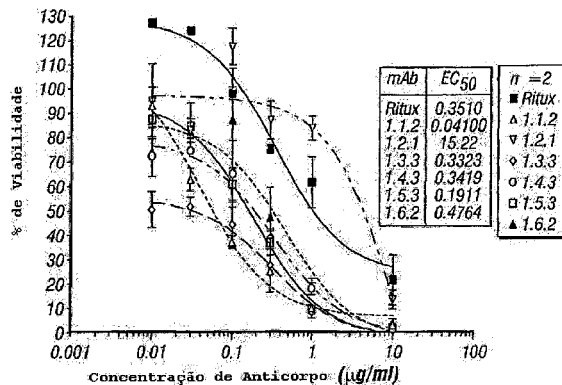
(72) Inventor(es): Christophe Queva, David Charles Blakey, Gadi Gazit-Bornstein, Larry L. Green, Xiaodong Yang

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2006020408 de 25/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/130458 de 07/12/2006

(57) Resumo: São aqui revelados anticorpos direcionados ao antígeno CD20 e usos de tais anticorpos. Em particular, anticorpos monoclonais completamente humanos direcionados ao antígeno CD20. São reveladas seqüências de nucleotídeos que codificam, e seqüências de aminoácidos que compreendem, moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada e leve, particularmente seqüências que correspondem a seqüências de cadeia pesada e leve contíguas que sobrepõem as regiões de estrutura e/ou regiões de determinação de complementaridade (CDR s), especificamente de FR1 a FR4 ou CDR1 a CDR3. Hibridomas ou outras linhas de células que expressam tais moléculas de imunoglobulina e anticorpos monoclonais são também revelados.



ANTICORPOS DIRECIONADOS PARA CD20 E USOS DOS MESMOS**REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

Este pedido reivindica prioridade de acordo com a 35
U.S.C. §119 para Pedido Provisório U.S. No. de Série
5 60/686.992, depositado em 2 de junho de 2005, que é aqui
incorporado por referência.

FUNDAMENTO DA INVENÇÃOCampo da Invenção

A invenção relaciona-se a anticorpos monoclonais
10 contra o antígeno alvo CD20 e usos de tais anticorpos. Mais
especificamente, a invenção relaciona-se a anticorpos
monoclonais completamente humanos direcionados a CD20 e
usos desses anticorpos. Aspectos da invenção também se
relacionam a hibridomas ou outras linhas de células que
15 expressam tais anticorpos. Os anticorpos descritos são
úteis como diagnósticos e para o tratamento de doenças
associadas à atividade e/ou superexpressão de CD20 e/ou a
presença e/ou atividade de células CD20⁺.

Descrição da técnica relacionada

20 CD20 é uma glico-fosfoproteína de 33.000 de peso
molecular que tem 298 aminoácidos de comprimento. O gene
humano CD20 tem 1.653 pares de base de comprimento. A 5'UTR
tem 147 pares de base em comprimento. A sequência
codificadora tem 893 pares de base, enquanto a 3'UTR tem
25 613 pares de base de comprimento.

CD20 é expressa em alta densidade apenas na superfície
de células normais e neoplásicas da linhagem do linfócito
B, e acredita-se que funcione como um receptor durante a
ativação da célula B. Células-tronco e progenitores de
30 célula B aparentemente são desprovidos de antígeno CD20. A

seqüência de aminoácidos prevista de CD20 revela uma proteína altamente hidrofóbica com 4 domínios que transpõem a membrana, com os terminais amino e carboxi da proteína localizados no citoplasma. Uma região hidrofílica curta
5 está localizada entre os resíduos 142 e 185 e pode ser exposta na superfície da célula.

Três isoformas de CD20 humana tendo pesos de 33, 35 e 37 kDa resultam de fosforilação diferencial de uma proteína única. CD20 não partilha qualquer homologia significativa
10 com outras proteínas conhecidas. Há uma homologia de 73% entre seqüências humanas e de camundongo com a maior similaridade nas regiões de transmembrana.

CD20 está intimamente associada com outras proteínas, em particular a proteína de ligação a quinase C-terminal src (Cbp), CD40, e proteínas de complexo de
15 histocompatibilidade principal Classe II (MHC II). Constatou-se que a ligação de anticorpo a CD20 em alguns casos induz a rápida translocação da molécula para balsas lipídicas (microdomínio enriquecido de colesterol em
20 membranas celulares).

Várias companhias vendem atualmente agentes terapêuticos que visam à proteína CD20. Rituxan® (Rituximab) (Genentech, South San Francisco, CA), Tositumomab® (GlaxoSmithKline, Brentford, Middlesex, United
25 Kingdom) e HuMax-CD20 (Genmab, Copenhagen, Denmark) são terapêuticos de anticorpo monoclonal que visam à proteína CD20.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Modalidades da invenção relacionam-se a agentes de
30 ligação direcionados que se ligam especificamente a CD20 e

inibem o crescimento de células que expressam CD20. Mecanismos pelos quais isso pode ser realizado podem incluir, e não são limitados a, indução de apoptose das células que expressam CD20, indução de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em células que expressam CD20, ou indução de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) em células que expressam CD20, dessa forma erradicando células B positivas para CD20 que incluem células de linfoma CD20⁺, células de leucemia CD20⁺ e células B normais.

Em uma modalidade da invenção, o agente de ligação direcionado é um anticorpo totalmente humano que se liga a CD20 e induz apoptose das células que expressam CD20. Ainda uma outra modalidade da invenção é um anticorpo monoclonal totalmente humano que se liga a CD20 e induz citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em células que expressam CD20. Uma outra modalidade da invenção é um anticorpo monoclonal totalmente humano que se liga a CD20 e induz citotoxicidade dependente de complemento (CDC) em células que expressam CD20.

Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a CD20 e induz apoptose das células que expressam CD20 com uma EC₅₀ de cerca de 0,5 µg/ml ou menos em um ensaio de viabilidade padrão CellTiterGlo de células Ramos. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, tem uma EC₅₀ de não mais que cerca de 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, ou 0,02 µg/ml para indução de apoptose das células B em um ensaio de viabilidade padrão CellTiterGlo de células Ramos. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao

antígeno deste, se liga a CD20 e induz apoptose das células que expressam CD20 com uma EC_{50} de cerca de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ ou menos em um ensaio de viabilidade padrão Alamar Blue de células Ramos. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou
5 porção de ligação ao antígeno deste, tem uma EC_{50} de não mais que cerca de 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, ou 0,04 $\mu\text{g/ml}$ em um ensaio de viabilidade padrão Alamar Blue de células Ramos.

Outra modalidade da invenção é um anticorpo que
10 compete por ligação com qualquer um dos agentes de ligação direcionados ou anticorpos aqui descritos.

Em uma modalidade, o anticorpo se liga a CD20 com uma K_D de menos que 12 nanomolar (nM). Em uma outra modalidade, o anticorpo se liga com uma K_D de menos que 10 nM, 9 nM, 8
15 Nm, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM ou 1 nM. Em uma modalidade, o anticorpo se liga com uma K_D de 500, 100, 30, 20, 10, ou 5 pM. Medições de afinidade e/ou avides podem ser medidas por FMAT, FACS, KinEXA® e/ou BIAcore®, como aqui descrito.

20 Em uma modalidade, o anticorpo compreende a sequência de aminoácidos de cadeia pesada que tem uma região de determinação de complementaridade (CDR) com uma das sequências mostradas na Tabela 8. Observa-se que aqueles de habilidade comum na técnica podem realizar facilmente
25 determinações de CDR. Veja, por exemplo, Kabat e cols., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Uma modalidade é um agente de ligação direcionado que se liga a CD20 e compreende região de determinação de
30 complementaridade de cadeia pesada 1 (CDR1) que tem uma

seqüência de aminoácidos de GYSFTSYWIG (Id. de Seq. N°: 201).

Ainda outra modalidade é um anticorpo que se liga a CD20 e compreende uma seqüência de aminoácidos de cadeia leve que tem uma CDR que compreende uma das seqüências mostradas na Tabela 9. Em certas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal totalmente humano. Portanto, uma modalidade é um agente de ligação direcionado que se liga a CD20 e compreende uma região de determinação de complementaridade 2 de cadeia leve (CDR2) que tem uma seqüência de aminoácidos de KISNRFS (Id. de Seq. N°: 202).

Uma modalidade adicional é um anticorpo que se liga a CD20 e compreende a seqüência de aminoácidos de cadeia pesada que tem uma das seqüências de CDR mostradas na Tabela 8 e a seqüência de aminoácidos de cadeia leve que tem uma das seqüências de CDR mostradas na Tabela 9. Em certas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal totalmente humano. Em algumas modalidades, a invenção fornece um anticorpo que se liga ao mesmo epítipo como qualquer um dos anticorpos aqui revelados.

Uma modalidade fornece um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação a antígeno deste, em que o anticorpo, ou porção de ligação, compreende um polipeptídeo de cadeia pesada que tem a seqüência de Id. de Seq. N°:2. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção de ligação deste, também compreende um polipeptídeo de cadeia leve que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 4. Uma outra modalidade é um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação ao antígeno deste, em que o anticorpo, ou porção de ligação, compreende um polipeptídeo de cadeia pesada que tem a seqüência de Id.

de Seq. N°: 30. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção de ligação deste, também compreende um polipeptídeo de cadeia leve que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 32. Ainda outra modalidade é um anticorpo monoclonal, ou porção
5 de ligação ao antígeno deste, em que o anticorpo, ou porção de ligação, compreende um polipeptídeo de cadeia pesada que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 46. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção de ligação deste, também compreende um polipeptídeo de cadeia leve que tem a seqüência de Id. de
10 Seq. N°: 48.

Modalidades adicionais da invenção incluem anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente a CD20, em que os anticorpos compreendem a região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 1 (CDR1) que corresponde
15 à classe canônica 1. Os anticorpos aqui fornecidos também podem incluir a região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 2 (CDR2) que corresponde à classe canônica 2, uma região de determinação de complementaridade 1 (CDR1) de cadeia leve que corresponde à classe canônica 4, uma
20 região de determinação de complementaridade 2 de cadeia leve (CDR2) que corresponde à classe canônica 1, e uma região de determinação de complementaridade 3 de cadeia leve (CDR3) que corresponde à classe canônica 1.

Outras modalidades da invenção incluem anticorpos
25 monoclonais humanos que se ligam a CD20 e compreendem um polipeptídeo de cadeia pesada derivado de uma seqüência de linhagem germinativa VH5-51. Algumas modalidades da invenção incluem anticorpos monoclonais humanos que se ligam a CD20 e compreendem uma cadeia leve Vk. Ainda outras
30 modalidades da invenção incluem um anticorpo monoclonal que

compreende uma cadeia leve Vk pareada com uma cadeia pesada codificada por, ou derivada de, um gene de cadeia pesada VH5-51. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de cadeia leve Vk é codificado por, ou derivado de, um gene de cadeia leve A23.

Ainda outra modalidade é um agente de ligação direcionado que se liga a resíduos de aminoácido 171-179 do domínio extracelular humano de CD20. Em outras modalidades, a invenção fornece um agente de ligação direcionado que
10 liga um epitopo que compreende o peptídeo NPSEKNSPS (Id. de Seq. N°: 196). Ainda em outras modalidades, a invenção fornece agente de ligação direcionado que não requer Alanina 170 para ligação ao domínio extracelular de CD20.

Uma modalidade da invenção compreende anticorpos
15 monoclonais totalmente humanos 1.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7329), 2.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7328) e 1.5.3 (ATCC Número de acesso PTA-7330) que se ligam especificamente a CD20, como discutido em maiores detalhes abaixo.

20 Uma modalidade da invenção é um anticorpo que se liga aos mesmos epitopos que os anticorpos monoclonais 1.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7329), 2.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7328) e 1.5.3 (ATCC Número de acesso PTA-7330).

Outras modalidades da invenção fornecem composições,
25 que incluem um anticorpo ou fragmento funcional deste, e um veículo farmacologicamente aceitável.

Ainda, modalidades adicionais da invenção incluem métodos de tratar, de modo eficaz, um animal que sofre de uma doença neoplásica, incluindo a seleção de um animal em
30 necessidade de tratamento para uma doença neoplásica, e

administração ao animal de uma dose terapeuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal totalmente humano que se liga especificamente a CD20.

Doenças neoplásicas tratáveis incluem, por exemplo,
5 linfomas, incluindo linfomas de célula B, como linfoma não Hodgkin (NHL), incluindo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras e neoplasias de células B maduras, como leucemia linfocítica crônica de células B (CLL), linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia pró-linfocítica
10 de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células do manto (MCL), linfoma folicular (LF), incluindo LF de baixo grau, grau intermediário e de alto grau, linfoma de centro do folículo cutâneo, linfoma B de zona marginal (tipo MALT, nodal e tipo esplênico), leucemia de células
15 pilosas, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmática, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante, macroglobulinemia de Waldenström, e linfoma de célula grande anaplásico (ALCL). Além disso, exemplos incluem B-
20 NHL refratário ou de recidiva após terapia com Rituxan®.

Modalidades adicionais da invenção incluem métodos de tratar, de modo eficaz, um animal que sofre de uma doença do sistema imune, que incluem a seleção de um animal em necessidade de tratamento para uma doença do sistema imune,
25 e administração ao animal de uma dose terapeuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal totalmente humano que se liga especificamente a CD20.

Doenças do sistema imune tratáveis incluem, por exemplo, mas não são limitadas a, doença de Crohn,
30 Granulomatose de Wegener, psoríase, artrite psoriática,

dermatite, escleroderma e esclerose sistêmica, doença inflamatória do intestino (IBD), colite ulcerativa, síndrome da angústia respiratória, meningite, encefalite, uveíte, glomerulonefrite, eczema, asma, aterosclerose, deficiência de adesão de leucócitos, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil, doença de Reiter, doença de Behcet, nefrite de complexo imune, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenias imune-mediadas, como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia gravis, nefrite de lúpus, lúpus eritematoso disseminado, artrite reumatóide (RA), dermatite atópica, pênfigo, doença de Grave, tireoidite de Hashimoto, síndrome de Omenn, insuficiência renal crônica, mononucleose infecciosa aguda, doenças associadas ao HIV e herpes vírus. Distúrbios adicionais incluem síndrome da angústia respiratória aguda severa e coriorretinite. Outros exemplos são doenças e distúrbios causados por infecção de células B com vírus, como o vírus de Epstein Barr (EBV).

Modalidades adicionais da invenção incluem métodos de inibição de crescimento de tumor de células B em um animal. Esses métodos incluem a seleção de um animal em necessidade de tratamento para crescimento de tumor de células B, e administração ao animal de uma dose terapeuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal totalmente humano em que o referido anticorpo se liga especificamente a CD20.

Modalidades adicionais da invenção incluem o uso de um anticorpo na preparação de um medicamento para o tratamento de doenças que envolvem a expressão de CD20 em um animal,

em que o anticorpo monoclonal se liga especificamente a CD20.

Em outras modalidades, os anticorpos aqui descritos podem ser usados para a preparação de um medicamento para o
5 tratamento de doenças neoplásicas em um animal, em que o anticorpo se liga especificamente a CD20. Doenças neoplásicas tratáveis incluem linfomas, incluindo linfomas de células B, como linfoma não Hodgkin (NHL).

Modalidades adicionais incluem o uso de um anticorpo
10 na preparação de um medicamento para o tratamento de doenças imunes em um animal, em que o anticorpo se liga especificamente a CD20.

Doenças tratáveis que envolvem a expressão de CD20 incluem, por exemplo, doenças neoplásicas, como NHL,
15 incluindo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras e neoplasias de células B maduras, como leucemia linfocítica crônica de células B (CLL), linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia pró-linfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células do
20 manto (MCL), linfoma folicular (LF), incluindo LF de baixo grau, grau intermediário e de alto grau, linfoma de centro do folículo cutâneo, linfoma B de zona marginal (tipo MALT, nodal e tipo esplênico), leucemia de células pilosas, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt,
25 plasmacitoma, mieloma de células plasmática, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante, macroglobulinemia de Waldenström, e linfoma de célula grande anaplásico (ALCL). Além disso, exemplos incluem B-NHL refratário ou de recidiva após terapia com Rituxan®. Exemplos de doenças
30 imunes incluem doença de Crohn, Granulomatose de Wegener,

psoríase, artrite psoriática, dermatite, escleroderma e esclerose sistêmico, doença inflamatória do intestino (IBD), colite ulcerativa, síndrome da angústia respiratória, meningite, encefalite, uveíte, glomerulonefrite, eczema, asma, aterosclerose, deficiência de adesão de leucócitos, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil, doença de Reiter, doença de Behcet, nefrite de complexo imune, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenias imune-mediadas, como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia gravis, nefrite de lúpus, lúpus eritematoso disseminado, artrite reumatóide (RA), dermatite atópica, pênfigo, doença de Grave, tireoidite de Hashimoto, síndrome de Omenn, insuficiência renal crônica, mononucleose infecciosa aguda, doenças associadas ao HIV e herpes vírus. Distúrbios adicionais incluem síndrome da angústia respiratória aguda severa e coriorretinite. Outros exemplos são doenças e distúrbios causados por infecção de células B com vírus, como o vírus de Epstein Barr (EBV).

Modalidades da invenção aqui descritas relacionam-se a anticorpos monoclonais que se ligam a CD20 e afetam a função de CD20. Outras modalidades relacionam-se a anticorpos anti-CD20 totalmente humanos e preparações de anticorpo anti-CD20 com propriedades desejáveis de uma perspectiva terapêutica, incluindo alta afinidade de ligação para CD20, a capacidade de erradicar células CD20 positivas e células de linfoma B *in vitro* e *in vivo*, a capacidade de induzir apoptose *in vitro* e *in vivo*, a capacidade de despertar atividade de ADCC *in vitro* e *in*

vivo, a capacidade de induzir CDC *in vitro* e *in vivo*, e/ou a capacidade de inibir o crescimento de tumor de células B. Ainda outras modalidades relacionam-se a anticorpos anti-CD20 totalmente humanos e preparações de anticorpo anti-CD20 que não resultam em resposta significativa de Anticorpo Anti-quimérico Humano (HACA), dessa forma permitindo uma administração repetida.

Portanto, uma modalidade aqui descrita inclui anticorpos isolados, ou fragmentos daqueles anticorpos, que se ligam a CD20. Como conhecido na técnica, os anticorpos podem ser vantajosamente, por exemplo, policlonais, oligoclonais, monoclonais, quiméricos, humanizados e/ou anticorpos totalmente humanos. Modalidades da invenção aqui descritas também fornecem células para produção desses anticorpos.

Deve-se observar que as modalidades da invenção não são limitadas a qualquer forma particular de um anticorpo ou método de geração ou produção. Por exemplo, o anticorpo anti-CD20 pode ser um anticorpo de comprimento total (por exemplo, que tem uma região Fc humana intacta) ou um fragmento de anticorpo (por exemplo, um Fab, Fab' ou F(ab')₂). Em adição, o anticorpo pode ser manufaturado a partir de um hibridoma que secreta o anticorpo, ou a partir de uma célula recombinantemente produzida que foi transformada ou transfectada com um gene ou genes que codificam o anticorpo. Além disso, os anticorpos podem ser anticorpos de domínio único como domínios VH ou VL únicos humanos ou camelídeos que se ligam a CD20.

Outras modalidades da invenção incluem moléculas de ácido nucléico isolado que codificam qualquer um dos

anticorpos aqui descritos, vetores que têm moléculas de ácido nucléico isolado que codificam anticorpos anti-CD20 ou uma célula hospedeira transformada com qualquer uma dessas moléculas de ácido nucléico. Em adição, uma
5 modalidade da invenção é um método de produção de um anticorpo anti-CD20 por cultura de células hospedeiras sob condições em que uma molécula de ácido nucléico é expressa para produzir o anticorpo seguido por recuperação do anticorpo.

10 Uma modalidade adicional inclui um método de produção de anticorpos de alta afinidade para CD20 por imunização de um mamífero com células que expressam CD20 humana, membranas de células isoladas que contêm CD20 humana, CD20 humana purificada ou um fragmento destas, e/ou uma ou mais
15 seqüências ortólogas ou fragmentos destas.

Outras modalidades são baseadas na geração e identificação de anticorpos isolados que se ligam especificamente a CD20. CD20 é expressa em mais de 90% dos linfomas de células B. Anticorpos que medeiam à morte de
20 células B que expressam CD20 podem evitar o crescimento induzido por CD20 e outros efeitos desejados. Anticorpos que medeiam à morte de células B não malignas podem ser usados para tratar ou prevenir doenças imunes.

Outra modalidade da invenção inclui um método de
25 diagnóstico de doenças ou condições nas quais um anticorpo preparado como aqui descrito é utilizado para detectar o nível de CD20 em um paciente. Em modalidades adicionais, são apresentados métodos para a identificação de fatores de risco, diagnóstico de doença, e grau da doença que envolvem
30 a identificação da expressão e/ou superexpressão de CD20

que usa anticorpos anti-CD20. Em algumas modalidades, os métodos compreendem a administração a um paciente de um conjugado de anticorpo totalmente humano que se liga seletivamente a uma proteína CD20 em uma célula. O
5 conjugado de anticorpo compreende um anticorpo que se liga seletivamente a CD20 e um rótulo. Os métodos também compreendem a observação da presença do rótulo no paciente. Uma quantidade relativamente alta do rótulo indicará um
10 risco relativamente alto da doença e uma quantidade relativamente baixa do rótulo indicará um risco relativamente baixo da doença. Em uma modalidade, o rótulo é uma proteína fluorescente verde.

A invenção também fornece métodos para análise do nível de CD20 em uma amostra do paciente, que compreendem o
15 contato de um anticorpo anti-CD20 com uma amostra biológica de um paciente, e detecção do nível de ligação entre o referido anticorpo e CD20 na referida amostra. Em modalidades mais específicas, a amostra biológica é sangue ou soro.

20 Outra modalidade da invenção inclui um método para o diagnóstico de uma condição associada à expressão de CD20 em uma célula por contato de soro ou de uma célula com um anticorpo anti-CD20, e depois detecção da presença de CD20.

Em outra modalidade, a invenção inclui um kit de
25 ensaio para detecção de CD20 em tecidos, células ou fluidos corporais de mamíferos para rastrear doenças que envolvem células que expressam CD20. O kit inclui um anticorpo que se liga a CD20 e um meio de indicação da reação do anticorpo com CD20, se presente. Preferivelmente, o
30 anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em uma modalidade, o

anticorpo que se liga a CD20 é rotulado. Em outra modalidade, o anticorpo é um anticorpo primário não rotulado e o kit também inclui um meio para a detecção do anticorpo primário. Em uma modalidade, o meio inclui um
5 segundo anticorpo rotulado que é uma anti-imunoglobulina. Preferivelmente o anticorpo é rotulado com um marcador selecionado do grupo que consiste em um flúorcromo, uma enzima, um radionuclídeo e um material radiopaco.

Ainda outra modalidade inclui métodos para o
10 tratamento de doenças ou condições associadas à expressão de CD20 em um paciente, por administração ao paciente de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD20. O anticorpo anti-CD20 pode ser administrado isoladamente, ou pode ser administrado em combinação com anticorpos
15 adicionais ou medicamento quimioterápico ou terapia de radiação. Por exemplo, uma mistura monoclonal, oligoclonal ou policlonal de anticorpos CD20 que induzem a apoptose das células de linfoma B e/ou despertam ADCC e/ou induzem CDC pode ser administrada em combinação com um medicamento que
20 inibe a proliferação da célula tumoral diretamente. O método pode ser realizado *in vivo* e o paciente é preferivelmente um paciente humano.

Em algumas modalidades, os anticorpos anti-CD20 podem ser modificados para aumentar sua capacidade de fixar
25 complemento e participar na citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Em outras modalidades, os anticorpos anti-CD20 podem ser modificados para melhorar sua capacidade de ativar células efetoras e de participar na citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC). Ainda em
30 outras modalidades, os anticorpos anti-CD20 podem ser

modificados para melhorar sua capacidade de ativação de células efectoras e de participar na citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC) e para melhorar sua capacidade de fixar complemento e de participar na
5 citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

Em outra modalidade, a invenção fornece um artigo de manufatura que inclui um recipiente. O recipiente inclui uma composição que contém um anticorpo anti-CD20, e uma inserção ou rótulo que indica que a composição pode ser
10 usada para tratar doenças caracterizadas pela expressão ou superexpressão de CD20.

Em outras modalidades, a invenção fornece um kit para o tratamento de doenças que envolvem a expressão de CD20, que compreende anticorpos monoclonais anti-CD20 e
15 instruções para administrar os anticorpos monoclonais a uma pessoa em necessidade de tratamento.

Em outro aspecto, é fornecido um método para matar seletivamente uma célula cancerosa em um paciente. O método compreende a administração de um conjugado de anticorpo
20 totalmente humano a um paciente. O conjugado de anticorpo totalmente humano compreende um anticorpo que pode se ligar ao domínio extracelular de CD20 e um agente. O agente é uma toxina, um radioisótopo, ou uma outra substância que matará uma células cancerosa. O conjugado de anticorpo, dessa
25 forma, mata seletivamente a célula cancerosa. O agente pode ser saporina.

Em um aspecto, é fornecido um anticorpo totalmente humano conjugado que se liga a CD20. Anexado ao anticorpo está um agente, e a ligação do anticorpo a uma célula
30 resulta na liberação do agente para a célula. Em uma

modalidade, o anticorpo totalmente humano conjugado acima se liga a um domínio extracelular de CD20. Em outra modalidade, o anticorpo e a toxina conjugada são internalizados por uma célula que expressa CD20. Em outra
5 modalidade, o agente é um agente citotóxico. Em outra modalidade, o agente é saporina. Ainda em outra modalidade, o agente é um radioisótopo.

Em algumas modalidades da invenção, os padrões de glicosilação dos anticorpos aqui fornecidos são modificados
10 para melhorar a função efetora de ADCC e CDC. Veja Shields RL e cols., (2002) JBC. 277:26733; Shinkawa T e cols., (2003) JBC. 278:3466 e Okazaki A e cols., (2004) *J. Mol. Biol.*, 336: 1239.

BREVE DESCRIÇÃO DOS PROJETOS

15 As Figuras 1 e 2 são gráficos que mostram os resultados de ensaios de viabilidade de células CellTiterGlo sem entrecruzamento de células de Ramos incubadas com mAbs 1.1.2, 1.2.1, 1.3.3, 1.4.3, 1.5.3, 1.6.2 (Figura 1), 1.9.2, 1.12.3, 1.13.2, 2.1.2, 2.2.2, 2.4.1
20 (Figura 2), e o controle de anticorpo Rituxan® ("Rituximab"). A viabilidade percentual das células de Ramos é mostrada no eixo y e a concentração de anticorpo é mostrada no eixo x.

As Figuras 3A-3D são gráficos que mostram os
25 resultados de ensaios de viabilidade celular Alamar Blue sem cruzamento de células de Ramos incubadas com mAbs 1.6.2, 1.5.3, 1.4.3 (Figura 3A), 1.3.3, 1.1.2, B1 (Figura 3B), 2.4.1, 2.2.2, 2.1.2 (Figura 3C), 1.13.2, 1.12.3, B1 (Figura 3D), Rituximab, IgM e IgG1. O % de viabilidade é
30 mostrado no eixo y e a concentração de anticorpo é mostrada

no eixo x.

As Figuras 4A-4D são gráficos que mostram os resultados de ensaios de viabilidade celular WST-1 sem cruzamento de células de Ramos incubadas com mAbs 1.1.2, 1.3.3, 1.4.3 (Figura 4A), 1.5.3, 1.6.2 (Figura 4B), 1.12.3, 1.13.2 (Figura 4C), 2.1.2, 2.2.2, 2.4.1 (Figura 4D), B1, Rituximab, IgG1 e IgM. O % de viabilidade é mostrado no eixo y e a concentração de anticorpo é mostrada no eixo x.

As Figuras 5 e 6 são gráficos que mostram os resultados de ensaios de apoptose Annexin V/PI sem cruzamento de células de Ramos incubadas com mAbs 1.1.2, 1.3.3, 1.4.3, 1.5.3, 1.6.2 (Figura 5), 1.12.3, 1.13.2, 2.1.2, 2.2.2, 2.4.1 (Figura 6), Rituximab e B1. O % de viabilidade é mostrado no eixo y e a concentração de anticorpo é no eixo x.

As Figuras 7A-7D, 8A-8D, e 9A-9D são gráficos que mostram os resultados de ensaios CDC de linhas de células Ramos (Figuras 7A-7D), Raji (Figuras 8A-8D) e Daudi (Figuras 9A- 9D), respectivamente, incubadas com mAbs 1.1.2, 1.2.1, 1.3.3 (A), 1.4.3, 1.5.3, 1.6.2 (B), 1.9.2, 1.12.3, 1.13.2 (C), 2.1.2, 2.2.2, 2.4.1 (D), Rituximab e controle de IgG1. O percentual de viabilidade é mostrado no eixo y e a concentração de anticorpo é mostrada no eixo x.

A Figura 10 é um gráfico que mostra resultados de um ensaio de ADCC de linha de células de Ramos incubadas com mAbs 2.1.2, 1.1.2, 1.5.3, 1.10.3.1, e 1.11.3.1, Rituximab e controle de IgG1. O % de viabilidade é mostrado no eixo y e a concentração de anticorpo é mostrada no eixo x.

As Figuras 11-12 são gráficos que mostram resultados de ensaios de ADCC de linhas de células Raji (Figura 11) e

Daudi (Figura 12) incubadas com mAbs 2.1.2, 1.1.2, 1.3.3, 1.5.3, Rituximab e IgG1. O % de viabilidade é mostrado no eixo y e a concentração de anticorpo é mostrada no eixo x.

5 A Figura 13 é um gráfico em barra que mostra os resultados de ensaios de sangue total de células de Raji, Ramos e Daudi incubadas com mAbs 1.1.2, 2.1.2, Rituximab e controle de IgG1 usando ensaios de sangue total. A lise percentual é mostrada no eixo y e as linhas de células de Raji, Ramos e Daudi, respectivamente, são mostradas no eixo
10 x. Os resultados demonstram que mAbs 1.1.2 e 2.1.2 medeiam maior lise celular quando comparadas a Rituximab.

As Figuras 14A e 14B são gráficos que mostram resultados de ensaios de sangue total de linhas de células de Karpas-422 (Figura 14A) e EHEB (Figura 14B) incubadas
15 com mAbs 2.1.2, 1.1.2, 1.5.3, 1.10.3.1, 1.11.3.1, Rituximab e controle de IgG1. O % de lise é mostrado no eixo y e a concentração de anticorpo é mostrada no eixo x. Os resultados demonstram que linhas de células EHEB e Karpas-422 são resistentes a tratamento com Rituximab enquanto os
20 anticorpos anti-CD20 acima medeiam níveis significativamente maiores de lise de células.

A Figura 15 é um gráfico de varredura que mostra os resultados de uma comparação de ensaio de sangue total da atividade lítica que usa mAbs 1.5.3, 1.1.2 e Rituximab em
25 um painel de linhas de células. Cada símbolo representa um doador humano de sangue total. A lise percentual a 10 µg/ml é mostrada no eixo y, e as linhas de células ARH-77, Daudi, EHEB, JMV2, MV3, Karpas422, Namalwa, Raji, Ramos, SC1, SU-DHL-4, e WSU-NHL, respectivamente, são mostradas no eixo x.

30 A Figura 16 é um gráfico de varredura que mostra a

proporção de lise em um ensaio de sangue total em um painel de linhas de células entre mAb 1.1.2 e Rituximab e entre mAb 1.5.3 e Rituximab. Cada símbolo representa um doador humano de sangue total. A proporção entre a lise percentual a 10 µg/ml para cada mAb anti-CD20 e a lise percentual atingida por Rituximab a 10 µg/ml para o mesmo doador de sangue é mostrada. As linhas de células ARH-77, Daudi, EHEB, JMV2, JMV3, Karpas422, Namalwa, Raji, Ramos, SC1, SU-DHL-4 e WSU-NHL, respectivamente, são mostradas no eixo x.

10 A Figura 17 é um gráfico em barra que mostra a lise de células resistentes a Rituximab RR1-Raji em um ensaio de sangue total por Rituximab, mAb 1.1.2 e mAb 1.5.3. A lise percentual é mostrada no eixo y e as células parentais de Raji tratadas em uma concentração de anticorpo de 1 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente, e células de RR1-Raji tratadas em uma concentração de anticorpo de 1 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente, são mostradas no eixo x.

A Figura 18 é um gráfico em barra que mostra a lise de células resistentes a Rituximab RR1-Ramos, RR6-Ramos e RR8-Ramos em um ensaio de sangue total por Rituximab e mAb 1.5.3. A lise percentual é mostrada no eixo y e as células parentais de Raji tratadas em uma concentração de anticorpo de 1 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente, células de Ramos RR1 tratadas em uma concentração de anticorpo de 1 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente, células de Ramos RR6 tratadas em uma concentração de anticorpo de 1 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente, células de Ramos RR8 tratadas em uma concentração de anticorpo de 1 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente, são mostradas no eixo x.

30 A Figura 19 é um gráfico em linha que mostra o efeito

de anticorpos anti-CD20, Rituximab, 2.1.2, 1.1.2 e 1.5.3 sobre a sobrevivência de camundongos em um modelo de paralisia i.v. de Ramos (CB17 SCID). Os resultados mostram que três anticorpos anti-CD20 demonstram potente atividade

5 anti-linfoma quando administrados como uma monoterapia de dose única. O número de dias de tratamento após o implante da célula tumoral é mostrado no eixo x e o percentual de sobrevivência é mostrado no eixo y.

A Figura 20 é um gráfico em linha que mostra a

10 eficácia de anticorpos anti-CD20 no modelo de tumor subcutâneo de Daudi. O número de dias de tratamento após o tempo da inoculação da célula tumoral é mostrado no eixo x e o volume do tumor em milímetros cúbicos é mostrado no eixo y.

15 A Figura 21 é um gráfico em linha que mostra a eficácia de anticorpos anti-CD20 no modelo de tumor subcutâneo de Namalwa. O número de dias de tratamento após o tempo da inoculação da célula tumoral é mostrado no eixo x e o volume do tumor em milímetros cúbicos é mostrado no

20 eixo y.

A Figura 22 é um gráfico em linha que mostra a eficácia de anticorpos anti-CD20 no modelo de tumor subcutâneo de RR1-Raji. O número de dias de tratamento após o tempo da inoculação da célula tumoral é mostrado no eixo

25 x e o volume do tumor em milímetros cúbicos é mostrado no eixo y.

A Figura 23 é um gráfico em linha que mostra a eficácia de anticorpos anti-CD20 no modelo de tumor subcutâneo de RR6-Ramos. O número de dias de tratamento

30 após o tempo da inoculação da célula tumoral é mostrado no

eixo x e o volume do tumor em milímetros cúbicos é mostrado no eixo y.

A Figura 24 é um gráfico em barra que mostra o esgotamento de células B teciduais em macaco cynomolgus após tratamento com veículo de controle (solução salina), Rituximab (10 mg/kg) e mAb 1.5.3 (10 mg/kg). A percentagem tecidual de CD20+CD40+ é mostrada no eixo y e amostras de linfonodos auxiliares, mesentéricos e inguinais, medula óssea e baço são mostradas no eixo x.

10 DESCRIÇÃO DETALHADA DA MODALIDADE PREFERIDA

Modalidades da invenção aqui descrita relacionam-se a anticorpos monoclonais que se ligam a CD20. Em algumas modalidades, os anticorpos se ligam a CD20 e induzem apoptose das células de linfoma B. Outras modalidades da invenção incluem anticorpos anti-CD20 totalmente humanos e preparações de anticorpo que são terapeuticamente úteis. Tais preparações de anticorpo anti-CD20 preferivelmente têm propriedades terapêuticas desejáveis, incluindo forte afinidade de ligação por CD20, a capacidade de induzir apoptose das células de linfoma B *in vitro* e *in vivo*, a capacidade de despertar a atividade de ADCC *in vitro* e *in vivo*, e a capacidade de induzir atividade de CDC *in vitro* e *in vivo*.

Modalidades da invenção também incluem fragmentos de ligação isolados de anticorpos anti-CD20. Preferivelmente, os fragmentos de ligação são derivados de anticorpos anti-CD20 totalmente humanos. Exemplos de fragmentos incluem Fv, Fab' ou outros fragmentos de anticorpo bem conhecidos, como descrito em maiores detalhes abaixo. Modalidades da invenção também incluem células que expressam anticorpos

totalmente humanos contra CD20. Exemplos de células incluem hibridomas, ou células criadas recombinantemente, como células de ovário de hamster da China (CHO) que produzem anticorpos contra CD20.

5 Além disso, as modalidades da invenção incluem métodos de uso desses anticorpos para o tratamento de doenças. Anticorpos anti-CD20 são úteis para erradicar células B positivas para CD20 e/ou células de linfoma B. O mecanismo de ação pode incluir a indução de apoptose das células que
10 expressam CD20, indução de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em células que expressam CD20, ou indução de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) em células que expressam CD20. Doenças que são tratáveis por esse mecanismo incluem, mas não são
15 limitadas a, doenças neoplásicas, como linfomas, que incluem linfomas de células B, como linfoma não Hodgkin (NHL), incluindo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras e neoplasias de células B maduras, como leucemia linfocítica crônica de células B (CLL), linfoma
20 linfocítico pequeno (SLL), leucemia pró-linfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células do manto (MCL), linfoma folicular (LF), incluindo LF de baixo grau, grau intermediário e de alto grau, linfoma de centro do folículo cutâneo, linfoma B de zona marginal (tipo MALT, nodal e tipo esplênico), leucemia de células pilosas,
25 linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmática, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante, macroglobulinemia de Waldenström, e linfoma de célula grande anaplásico (ALCL).
30 Além disso, exemplos incluem B-NHL refratário ou de

recidiva após terapia com Rituximab. Doenças imunes incluem doença de Crohn, Granulomatose de Wegener, psoríase, artrite psoriática, dermatite, escleroderma e esclerose sistêmico, doença inflamatória do intestino (IBD), colite
5 ulcerativa, síndrome da angústia respiratória, meningite, encefalite, uveíte, glomerulonefrite, eczema, asma, aterosclerose, deficiência de adesão de leucócitos, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil, doença de Reiter, doença de
10 Behcet, nefrite de complexo imune, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenias imune-mediadas, como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia gravis, nefrite de lúpus, lúpus eritematoso
15 disseminado, artrite reumatóide (RA), dermatite atópica, pênfigo, doença de Grave, tireoidite de Hashimoto, síndrome de Omenn, insuficiência renal crônica, mononucleose infecciosa aguda, doenças associadas ao HIV e herpes vírus. Distúrbios adicionais incluem síndrome da angústia
20 respiratória aguda severa e coriorretinite. Outros exemplos são doenças e distúrbios causados por infecção de células B com vírus, como o vírus de Epstein Barr (EBV).

Outras modalidades da invenção incluem ensaios diagnósticos para determinar especificamente a presença
25 e/ou quantidade de CD20 em um paciente ou amostra biológica. O kit de ensaio pode incluir anticorpos anti-CD20 junto com os rótulos necessários para detecção de tais anticorpos. Esses ensaios diagnósticos são úteis para rastrear doenças relacionada a CD20 que incluem, sem
30 limitação, doenças neoplásicas, como linfomas, que incluem

linfomas de células B, como linfoma não Hodgkin (NHL), incluindo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras e neoplasias de células B maduras, como leucemia linfocítica crônica de células B (CLL), linfoma

5 linfocítico pequeno (SLL), leucemia pró-linfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células do manto (MCL), linfoma folicular (LF), incluindo LF de baixo grau, grau intermediário e de alto grau, linfoma de centro do folículo cutâneo, linfoma B de zona marginal (tipo MALT,

10 nodal e tipo esplênico), leucemia de células pilosas, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmática, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante, macroglobulinemia de Waldenström, e linfoma de célula grande anaplásico (ALCL).

15 Em adição, exemplos incluem exemplos incluem B-NHL refratário ou de recidiva após terapia com Rituximab. Doenças imunes incluem doença de Crohn, Granulomatose de Wegener, psoríase, artrite psoriática, dermatite, escleroderma e esclerose sistêmico, doença inflamatória do

20 intestino (IBD), colite ulcerativa, síndrome da angústia respiratória, meningite, encefalite, uveíte, glomerulonefrite, eczema, asma, aterosclerose, deficiência de adesão de leucócitos, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil, doença de

25 Reiter, doença de Behcet, nefrite de complexo imune, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenias imune-mediadas, como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia gravis, nefrite de lúpus, lúpus

30 eritematoso disseminado, artrite reumatóide (RA), dermatite

atópica, pênfigo, doença de Grave, tireoidite de Hashimoto, síndrome de Omenn, insuficiência renal crônica, mononucleose infecciosa aguda, doenças associadas ao HIV e herpes vírus. Distúrbios adicionais incluem síndrome da angústia respiratória aguda severa e coriorretinite. Outros exemplos são doenças e distúrbios causados por infecção de células B com vírus, como o vírus de Epstein Barr (EBV).

Em uma modalidade, é fornecido um anticorpo monoclonal que compreende um polipeptídeo de cadeia pesada que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 2. Em uma modalidade, o anticorpo também compreende um polipeptídeo de cadeia leve que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 4. Outra modalidade fornece um anticorpo que compreende um polipeptídeo de cadeia pesada que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 30. Em uma modalidade, o anticorpo também compreende um polipeptídeo de cadeia leve que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 32. Ainda outra modalidade fornece um anticorpo que compreende um polipeptídeo de cadeia pesada que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 46. Em uma modalidade, o anticorpo também compreende um polipeptídeo de cadeia leve que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 48.

Em uma modalidade, é fornecido um hibridoma que produz a cadeia leve e/ou a cadeia pesada de anticorpo como aqui descrito acima. Preferivelmente, o hibridoma produz a cadeia leve e/ou a cadeia pesada de um anticorpo monoclonal totalmente humano. Mais preferivelmente, o hibridoma produz a cadeia leve e/ou a cadeia pesada do anticorpo monoclonal totalmente humano 1.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7329), 2.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7328) e 1.5.3 (ATCC Número de acesso PTA- 7330). Alternativamente, o hibridoma produz

um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo ou epitopos como anticorpo monoclonal totalmente humano 1.1.2 (ATCC Número de acesso PTA- 7329), 2.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7328) e 1.5.3 (ATCC Número de acesso PTA-733 0).

5 Em uma modalidade, é fornecida uma molécula de ácido nucléico que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada do anticorpo como aqui descrito acima.

Preferivelmente, é fornecida uma molécula de ácido nucléico que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada de
10 um anticorpo monoclonal totalmente humano. Mais preferivelmente, é fornecida uma molécula de ácido nucléico que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada do anticorpo monoclonal totalmente humano 1.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7329), 2.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7328) e 1.5.3
15 (ATCC Número de acesso PTA-7330).

Em uma modalidade da invenção, é fornecido um vetor que compreende a molécula de ácido nucléico ou moléculas, como aqui acima descrito, em que o vetor codifica uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada de um anticorpo como
20 acima definido.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma célula hospedeira que compreende um vetor como aqui acima descrito. Alternativamente, a célula hospedeira pode compreender mais de um vetor.

25 Em adição, uma modalidade da invenção é um método de produção de um anticorpo por cultura das células hospedeiras sob condições em que a molécula de ácido nucléico é expressa para produzir o anticorpo, seguido pela recuperação do anticorpo.

30 Em uma modalidade da invenção, é fornecido um método

de fazer um anticorpo que compreende a transfecção de pelo menos uma célula hospedeira com pelo menos uma molécula de ácido nucléico que codifica o anticorpo, como aqui acima descrito, expressando a molécula de ácido nucléico na referida célula hospedeira e isolando o referido anticorpo.

De acordo com outro aspecto da invenção, é fornecido um método de inibição do crescimento de células que expressam CD20 que compreende a administração de um agente de ligação direcionado como aqui acima descrito. O método pode incluir a seleção de um animal em necessidade de tratamento para doença relacionada à expressão de CD20, e administração ao referido animal de uma dose terapêuticamente eficaz de um agente de ligação direcionado que se liga especificamente a CD20.

De acordo com outro aspecto, é fornecido um método de tratamento de uma doença do sistema imune em um mamífero que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de ligação direcionado que se liga especificamente a CD20. O método pode incluir a seleção de um animal em necessidade de tratamento para uma doença imune, e administração ao animal de uma dose terapêuticamente eficaz de um agente de ligação direcionado que se liga especificamente a CD20.

De acordo com outro aspecto, é fornecido um método de tratamento de uma doença neoplásica em um mamífero que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de ligação direcionado que se liga especificamente a CD20. O método pode incluir a seleção de um animal em necessidade de tratamento para uma doença neoplásica, e administração ao referido animal de

uma dose terapeuticamente eficaz de um agente de ligação direcionado que liga especificamente CD20. O agente pode ser administrado isoladamente, ou pode ser administrado em combinação com um segundo agente anti-neoplásico
5 selecionado de um anticorpo, um medicamento quimioterápico ou um medicamento radioativo.

De acordo com outro aspecto, é fornecido um método de tratamento de câncer em um mamífero que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de
10 um agente de ligação direcionado que liga especificamente CD20. O método pode incluir seleção de um animal em necessidade de tratamento para câncer, e a administração ao referido animal de uma dose terapeuticamente eficaz de um agente de ligação direcionado que liga especificamente
15 CD20. O agente pode ser administrado isoladamente, ou pode ser administrado em combinação com um segundo agente anti-neoplásico selecionado de um anticorpo, um medicamento quimioterápico ou um medicamento radioativo.

De acordo com outro aspecto da invenção, é fornecido o
20 uso de um agente de ligação direcionado que liga especificamente CD20 para a manufatura de um medicamento para o tratamento de doenças do sistema imune.

De acordo com outro aspecto da invenção, é fornecido o uso de um agente de ligação direcionado que liga
25 especificamente CD20 para a manufatura de um medicamento para o tratamento de uma doença neoplásica.

Uma modalidade da invenção é particularmente adequada para uso na inibição do crescimento de tumor de células B em pacientes com um tumor que é dependente isoladamente, ou
30 em parte, da expressão de CD20.

Outra modalidade da invenção inclui um kit de ensaio para a detecção de CD20 em tecidos, células ou fluidos corporais de mamíferos ou para rastrear doenças neoplásicas e/ou doenças do sistema imune. O kit inclui um agente de
5 ligação direcionado que se liga a CD20 e um meio de indicação da reação do agente de ligação direcionado com CD20, se presente. O agente de ligação direcionado pode ser um anticorpo monoclonal. Em uma modalidade, o anticorpo que se liga a CD20 é rotulado. Em outra modalidade, o anticorpo
10 é um anticorpo primário não rotulado e o kit também inclui um meio para a detecção do anticorpo primário. Em uma modalidade, o meio inclui um segundo anticorpo rotulado que é uma anti-imunoglobulina. Preferivelmente, o anticorpo é rotulado com um marcador selecionado do grupo que consiste
15 em um flúorcromo, uma enzima, um radionuclídeo e um material radiopaco.

Modalidades adicionais, características e outros em relação a anticorpos anti-CD20 são fornecidos em detalhes adicionais abaixo.

20 Definições

A menos que definido de outra forma, termos científicos e técnicos aqui usados devem ter os significados que são comumente entendidos por aqueles de habilidade comum na técnica. Além disso, a menos que
25 requerido de outro modo pelo contexto, termos no singular devem incluir plurais e termos no plural devem incluir o singular. Geralmente, as nomenclaturas utilizadas junto com, e técnicas de cultura de tecido e células, biologia molecular e química, e hibridização de proteína e oligo ou
30 polinucleotídeo aqui descritas são aquelas bem conhecidas e

comumente usadas na técnica.

Técnicas padrão são usadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeo, e cultura de tecidos e transformação (por exemplo, eletroporação, lipofecção).

5 Reações enzimáticas e técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou como comumente realizadas na técnica ou como aqui descritas. As técnicas e os procedimentos anteriores são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e como descritos em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas por toda a presente especificação. Veja, por exemplo, Sambrook e cols. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)), que é aqui incorporado por referência. As nomenclaturas utilizadas junto com os procedimentos laboratoriais e técnicas de química analítica, química orgânica sintética e química medicinal e farmacêutica aqui descritas são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Técnicas padrão são usadas para síntese química, análise química, preparação farmacêutica, formulação e liberação, e tratamento de pacientes.

25 Como utilizado de acordo com a presente revelação, os seguintes termos, a menos que indicado de outra forma, devem ser compreendidos como tendo os seguintes significados:

Um composto refere-se a qualquer composto de pequeno peso molecular com um peso molecular de menos que cerca de 30 2.000 Daltons.

O termo "CD20" refere-se à glico-fosfoproteína CD20 de peso molecular de 33.000 que tem 298 aminoácidos de comprimento e é codificada pelo gene de CD20.

O termo "polinucleotídeo isolado" como aqui usado deve significar um polinucleotídeo que foi isolado de seu ambiente de ocorrência natural. Tais polinucleotídeos podem ser genômicos, cDNA ou sintéticos. Polinucleotídeos isolados preferivelmente não são associados com toda ou uma porção dos polinucleotídeos a que eles se associam na natureza. Os polinucleotídeos isolados podem ser operacionalmente ligados a outro polinucleotídeo que não é ligado em natureza. Em adição, polinucleotídeos isolados preferivelmente não ocorrem na natureza como parte de uma sequência maior.

O termo "proteína isolada" aqui referido significa uma proteína que foi isolada de seu ambiente de ocorrência natural. Tais proteínas podem ser derivadas de DNA genômico, cDNA, DNA recombinante, RNA recombinante, ou de origem sintética ou alguma combinação destes, e, em virtude de sua origem, ou fonte de derivação, a "proteína isolada" (1) não é associada a proteínas encontradas na natureza, (2) é livre de outras proteínas da mesma fonte, por exemplo, livre de proteínas de murídeo, (3) é expressa por uma células de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza.

O termo "polipeptídeo" é aqui usado como um termo genérico para se referir a proteína nativa, fragmentos, ou análogos de uma sequência de polipeptídeos. Portanto, proteína nativa, fragmentos, e análogos são espécies do gênero polipeptídeo. Polipeptídeos preferidos de acordo com

a invenção compreendem as moléculas de imunoglobulina humana de cadeia pesada e as moléculas de imunoglobulina humana de cadeia leve kappa, bem como moléculas de anticorpo formadas por combinações que compreendem as
5 moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada com moléculas de imunoglobulina de cadeia leve, como as moléculas de imunoglobulina de cadeia leve kappa ou lambda, e vice-versa, bem como fragmentos e análogos destas. Polipeptídeos preferidos de acordo com a invenção também podem
10 compreender apenas as moléculas de imunoglobulina humana de cadeia pesada ou fragmentos destas.

O termo "de ocorrência natural" como aqui usado como aplicado a um objeto refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma seqüência
15 de polipeptídeos ou polinucleotídeos que está presente em um organismo (incluindo vírus), que pode ser isolada de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificada pelo homem ou em laboratório ou de outra forma é de ocorrência natural.

20 O termo "operacionalmente ligado" como aqui usado refere-se a posições de componentes assim descritos que estão em uma relação que permite que eles funcionem em sua maneira pretendida. Por exemplo, uma seqüência de controle "operacionalmente ligada" a uma seqüência codificadora é
25 conectada de tal forma que a expressão da seqüência codificadora é atingida sob condições compatíveis com as seqüências de controle.

O termo "seqüência de controle" como aqui usado refere-se a seqüências de polinucleotídeos que são
30 necessárias para efetuar ou para afetar a expressão e

processamento de seqüências codificadoras às quais elas são conectadas. A natureza de tais seqüências de controle difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotas, tais seqüências de controle geralmente incluem promotor, 5 sítio de ligação ribossômica, e seqüência de terminação de transcrição; em eucariotas, geralmente, tais seqüências de controle podem incluir promotores, intensificadores, íntrons, seqüências de terminação de transcrição, seqüências de sinal de poliadenilação, e regiões não 10 traduzidas 5' e 3'. O termo "seqüências de controle" deve incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é essencial para a expressão e processamento, e também pode incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, seqüências líderes e seqüências de parceiro de 15 fusão.

O termo "polinucleotídeo" como aqui referido significa uma forma polimérica de nucleotídeos de pelo menos 10 bases de comprimento, ribonucleotídeos ou desoxinucleotídeos ou uma forma modificada de cada tipo de nucleotídeo, ou 20 heteroduplex RNA-DNA. O termo inclui formas de filamento único ou duplo de DNA.

O termo "oligonucleotídeo" aqui referido inclui nucleotídeos de ocorrência natural, e modificados ligados por ligações de ocorrência natural e de ocorrência não 25 natural. Oligonucleotídeos são um subconjunto de polinucleotídeos que geralmente compreende um comprimento de 200 bases ou menos. Preferivelmente, oligonucleotídeos têm 10 a 60 bases de comprimento e mais preferivelmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 a 40 bases de comprimento. 30 Oligonucleotídeos são comumente de filamento único, por

exemplo, para marcadores; embora oligonucleotídeos possam ser de duplo filamento, por exemplo, para uso na construção de um mutante de gene. Oligonucleotídeos podem ser oligonucleotídeos senso ou anti-senso.

5 O termo "nucleotídeos de ocorrência natural" aqui referido inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" aqui referido inclui nucleotídeos com grupos açúcar modificados ou substituídos e outros. O termo "ligações de oligonucleotídeo" aqui
10 referido inclui ligações de oligonucleotídeos como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato e outros. Veja, por exemplo, LaPlanche e cols. *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec e cols. *J. Am.*
15 *Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein e cols. *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon e cols. *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon e cols. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87- 108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec e cols.
20 Patente U.S. No. 5.151.510; Uhlmann e Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990), cujas revelações estão aqui incorporadas por referência. Um oligonucleotídeo pode incluir um rótulo para detecção, se desejado.

O termo "hibridiza seletivamente" aqui referido
25 significa ligação detectável e específica. Polinucleotídeos, oligonucleotídeos e fragmentos destes hibridizam seletivamente a filamentos de ácido nucléico sob condições de hibridização e de lavagem que minimizam quantidades consideráveis de ligação detectável a ácidos
30 nucléicos não específicos. Condições de alto rigor podem

ser usadas para atingir condições de hibridização seletivas como conhecido na técnica e aqui discutido. Geralmente, a homologia de seqüência de ácidos nucléicos entre os polinucleotídeos, oligonucleotídeos, ou fragmentos de anticorpo e uma seqüência de ácidos nucléicos de interesse terá pelo menos 80%, e mais tipicamente com preferivelmente homologias crescentes de pelo menos 85%, 90%, 95%, 99%, e 100%.

Duas seqüências de aminoácidos são "homólogas" se houver uma identidade parcial ou completa entre suas seqüências. Por exemplo, 85% de homologia significa que 85% dos aminoácidos são idênticos quando as duas seqüências são alinhadas para combinação máxima. Lacunas (em cada uma das duas seqüências sendo combinadas) são permitidas na combinação de maximização; comprimentos de lacuna de 5 ou menos são preferidos com 2 ou menos sendo mais preferido. Alternativamente e preferivelmente, duas seqüências de proteínas (ou seqüências de polipeptídeos derivadas delas de pelo menos cerca de 30 aminoácidos de comprimento) são homólogas, como esse termo é aqui usado, se elas tiverem uma pontuação de alinhamento de mais que 5 (em unidades de desvio padrão) usando o programa ALIGN com a matriz de dados de mutação e uma penalidade de lacuna de 6 ou mais. Veja Dayhoff, M.O., em *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) e Suplemento 2 a esse volume, pp. 1-10. As duas seqüências ou partes destas são mais preferivelmente homólogas se seus aminoácidos são 50% idênticos ou mais quando alinhados de forma ótima usando o programa ALIGN. Deve-se perceber que pode haver regiões

diferentes de homologia com duas seqüências ortólogas. Por exemplo, os sítios funcionais de ortólogos de camundongo e humanos podem ter um maior grau de homologia que regiões não funcionais.

5 O termo "corresponde a" é aqui usado para significar que uma seqüência de polinucleotídeos é homóloga (ou seja, é idêntica, não estritamente relacionada evolutivamente) a toda ou uma porção de uma seqüência de polinucleotídeos de referência, ou que a seqüência de polipeptídeos é idêntica
10 a uma seqüência de polipeptídeos de referência.

Em contraposição, o termo "complementar a" é aqui usado para significar que a seqüência complementar é homóloga a toda ou uma porção de uma seqüência de polinucleotídeos de referência. Para ilustração, a
15 seqüência de nucleotídeos "TATAC" corresponde a uma seqüência de referência "TATAC" e é complementar a uma seqüência de referência "GTATA".

O termo "identidade de seqüência" significa que duas seqüências de polinucleotídeos ou aminoácidos são idênticas
20 (ou seja, em uma base de nucleotídeo-por-nucleotídeo ou resíduo-por-resíduo) na janela de comparação. O termo "percentagem de identidade de seqüência" é calculado pela comparação de duas seqüências otimamente alinhadas na janela de comparação, determinação do número de posições em
25 que a base de ácido nucléico idêntica (por exemplo, A, T, C, G, U, ou I) ou resíduo de aminoácido ocorre em ambas seqüências para produzir o número de posições combinadas, dividindo o número de posições combinadas pelo número total de posições na janela de comparação (ou seja, o tamanho da
30 janela), e multiplicando o resultado por 100 para gerar a

percentagem de identidade de seqüência. O termo "identidade substancial" como aqui usado denota uma característica de um polinucleotídeo ou seqüência de aminoácidos, em que o polinucleotídeo ou aminoácido compreende a seqüência que tem pelo menos 85 por cento de identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos 90 a 95 por cento de identidade de seqüência, mais preferivelmente pelo menos 99 por cento de identidade de seqüência, quando comparada a uma seqüência de referência em uma janela de comparação de pelo menos 18 posições de nucleotídeos (6 aminoácidos), freqüentemente em uma janela de pelo menos 24-48 posições de nucleotídeo (8-16 aminoácido), em que a percentagem de identidade de seqüência é calculada por comparação da seqüência de referência a uma seqüência que pode incluir deleções ou adições que totalizam 20 por cento ou menos da seqüência de referência na janela de comparação. A seqüência de referência pode ser um subconjunto de uma seqüência maior.

Como aqui usado, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem o uso convencional. Veja *Immunology - A Synthesis* (2ª Edição, E.S. Golub e D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que é aqui incorporada por referência. Estereoisômeros (por exemplo, D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais como aminoácidos α -, α -disubstituídos, N-alkil aminoácidos, ácido lático, e outros aminoácidos não convencionais também podem ser componentes adequados para os polipeptídeos da presente invenção. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-

trimetillisina, ϵ -N-acetillisina, O-fosfosserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, e outros aminoácidos similares e imino ácidos (por exemplo, 4-hidroxiprolina).

- 5 Na notação de polipeptídeo aqui usada, a direção esquerda é a direção amino terminal e a direção direita é a direção carboxi-terminal, de acordo com uso e convenção padrão.

De modo similar, a menos que especificado de outra forma, a extremidade esquerda das seqüências de polinucleotídeos de filamento único é a extremidade 5'; a
10 direção esquerda das seqüências de polinucleotídeos de filamento duplo é referida como a direção 5'. A direção da adição 5' a 3' de transcritos de RNA nascentes é referida como a direção de transcrição; as regiões da seqüência no
15 filamento de DNA que têm a mesma seqüência que o RNA e que são 5' para a extremidade 5' do transcrito de RNA são referidas como "seqüências acima"; regiões de seqüência no filamento de DNA que têm a mesma seqüência que o RNA e que
são 3' à extremidade 3' do transcrito de RNA são referidas
20 como "seqüências abaixo".

Como aplicado a polipeptídeos, o termo "identidade substancial" significa que duas seqüências de peptídeos, quando otimamente alinhadas, pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de lacuna padrão, partilham pelo menos 80 por
25 cento de identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos 90 por cento de identidade de seqüência, mais preferivelmente pelo menos 95 por cento de identidade de seqüência, e ainda mais preferivelmente pelo menos 99 por cento de identidade de seqüência. Preferivelmente, as
30 posições do resíduo que não são idênticas diferem em

substituições conservadoras de aminoácido. Substituições conservadoras de aminoácido referem-se à possibilidade de troca de resíduos que têm cadeias laterais similares. Por exemplo, um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais alifáticas é glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais de hidroxil alifáticas é serina e treonina; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais que contêm amida é asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais aromáticas é fenilalanina, tirosina, e triptofano; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais básicas é lisina, arginina e histidina; e um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais que contêm enxofre é cisteína e metionina. Grupos de substituição conservadora de aminoácido preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutâmico-aspartico e asparagina-glutamina.

Como aqui discutido, variações menores nas seqüências de aminoácidos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina são contempladas como sendo englobadas pela presente invenção, desde que as variações na seqüência de aminoácidos mantenham pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, 90%, 95%, e mais preferivelmente 99% de identidade de seqüência aos anticorpos ou moléculas de imunoglobulina aqui descritos. Em particular, substituições conservadoras de aminoácido são contempladas. Substituições conservadoras são aquelas que ocorrem em uma família de aminoácidos que têm cadeias laterais relacionadas. Aminoácidos geneticamente codificados são geralmente divididos em famílias: (1) ácidos = aspartato, glutamato;

(2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) não polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; e (4) polares não carregados = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Famílias mais preferidas são: serina e treonina são uma família hidroxí alifática; asparagina e glutamina são uma família que contém amida; alanina, valina, leucina e isoleucina são uma família alifática; e fenilalanina, triptofano e tirosina são uma família aromática. Por exemplo, é razoável esperar que uma substituição isolada de uma leucina com uma isoleucina ou valina, um aspartato com um glutamato, uma treonina com uma serina, ou uma substituição similar de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado não tenha um efeito grande sobre a função de ligação ou propriedades da molécula resultante, especialmente se a substituição não envolve um aminoácido em um local de estrutura. Pode-se determinar facilmente se uma modificação no aminoácido resulta em um peptídeo funcional por análise da atividade específica do derivado de polipeptídeo. Ensaios são aqui descritos em detalhes. Fragmentos ou análogos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina podem ser facilmente preparados por aqueles de habilidade comum na técnica. Terminais amino e carboxi preferidos de fragmentos ou análogos ocorrem próximo aos limites dos domínios funcionais. Domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados da sequência de nucleotídeos e/ou de aminoácidos a bases de dados de sequência públicas ou de propriedade. Preferivelmente, métodos de comparação computadorizada são usados para

identificar motivos de seqüência ou domínios de conformação de proteína previstos que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecida. Métodos para identificar seqüências de proteínas que se dobram em uma estrutura tridimensional conhecida são conhecidos. Bowie e cols. *Science* 253:164 (1991). Portanto, os exemplos anteriores demonstram que aqueles habilitados na técnica podem reconhecer motivos de seqüência e conformações estruturais que podem ser usadas para definir domínios estruturais e funcionais de acordo com os anticorpos aqui descritos.

Substituições de aminoácidos preferidas são aquelas que: (1) reduzem a suscetibilidade à proteólise, (2) reduzem a suscetibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar complexos de proteínas, (4) alteram afinidades de ligação, e (5) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais de tais análogos. Análogos podem incluir várias muteínas da seqüência diferente da seqüência de peptídeos de ocorrência natural. Por exemplo, substituições de aminoácido únicas ou múltiplas (preferivelmente substituições conservadoras de aminoácidos) podem ser feitas na seqüência de ocorrência natural (preferivelmente na porção do polipeptídeo fora do domínio(s) formando contatos intermoleculares). Uma substituição conservadora de aminoácido não deve trocar substancialmente as características estruturais da seqüência parente (por exemplo, um aminoácido de substituição não deve tender a quebrar uma hélice que ocorre na seqüência parente, ou romper outros tipos de estrutura secundária que caracteriza a seqüência parente). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de

polipeptídeos reconhecidas na técnica são descritos em *Protein, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman e Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden e I. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton e cols. *Nature* 354:105 (1991), que são aqui incorporados por referência.

O termo "fragmento de polipeptídeo" como aqui usado refere-se a um polipeptídeo que tem uma deleção amino-terminal e/ou carboxi-terminal, mas em que a seqüência de aminoácidos restante é idêntica às posições correspondentes na seqüência de ocorrência natural deduzida, por exemplo, de uma seqüência de cDNA de comprimento total. Fragmentos tipicamente têm pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento, preferivelmente pelo menos 14 aminoácidos de comprimento, mais preferivelmente pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, comumente pelo menos 50 aminoácidos de comprimento, e ainda mais preferivelmente pelo menos 70 aminoácidos de comprimento. O termo "análogo" como aqui usado refere-se a polipeptídeos que compreendem um segmento de pelo menos 25 aminoácidos que têm identidade substancial a uma porção de uma seqüência de aminoácidos deduzida e que têm pelo uma das seguintes propriedades: (1) ligação específica a uma CD20, sob condições de ligação adequadas, (2) capacidade de induzir apoptose das células que expressam CD20, (3) capacidade de despertar citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), ou (4) capacidade de induzir citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Tipicamente, análogos de polipeptídeo compreendem uma substituição conservadora de aminoácido (ou adição ou

deleção) com relação à seqüência de ocorrência natural. Análogos tipicamente têm pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, preferivelmente pelo menos 50 aminoácidos de comprimento ou mais, e podem freqüentemente ser tão longos quanto um polipeptídeo de ocorrência natural de comprimento total.

Análogos de peptídeo são comumente usados na indústria farmacêutica como medicamentos não peptídicos com propriedades análogas àsquelas do peptídeo modelo. Esses tipos de composto não peptídicos são denominados "miméticos de peptídeos" ou "peptidomiméticos". Fauchere, *J Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber e Freidinger *TINS* p.392 (1985); e Evans e cols. *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987), que são aqui incorporados por referência. Tais compostos são freqüentemente desenvolvidos com a ajuda de modelagem molecular computadorizada. Miméticos de peptídeos que são estruturalmente similares a peptídeos terapeuticamente úteis podem ser usados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Geralmente, peptidomiméticos são estruturalmente similares a um polipeptídeo paradigma (ou seja, um polipeptídeo que tem uma propriedade bioquímica ou atividade farmacológica), como anticorpo humano, mas têm uma ou mais ligações de peptídeo opcionalmente substituídas por uma ligação selecionada do grupo que consiste em --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH=CH-- (cis e trans), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂--, e --CH₂SO--, por métodos bem conhecidos na técnica. A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma seqüência de consenso com um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D-lisina no lugar de L-lisina) pode ser usada para gerar

peptídeos mais estáveis. Em adição, peptídeos restritos que compreendem uma seqüência de consenso ou uma variação de seqüência de consenso substancialmente idêntica podem ser gerados por métodos conhecidos na técnica (Rizo e Gierasch
5 *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), aqui incorporado por referência); por exemplo, por adição de resíduos de cisteína internos capazes de formar pontes de dissulfeto intramoleculares que ciclizam o peptídeo.

Como aqui usado, o termo "anticorpo" refere-se a um
10 polipeptídeo ou grupo de polipeptídeos que compreende pelo menos um domínio de ligação que é formado a partir da dobra das cadeias do polipeptídeo que têm espaços de ligação tridimensionais com formas de superfície interna e distribuições de carga complementares às características de
15 um determinante antigênico de um antígeno. Um anticorpo tipicamente tem uma forma tetramérica, que compreende dois pares idênticos de cadeia de polipeptídeo, cada par tendo uma cadeia "leve" e uma cadeia "pesada". As regiões variáveis de cada par de cadeia leve/pesada formam um sítio
20 de ligação de anticorpo.

Como aqui usado, um "agente de ligação direcionado" é um anticorpo, ou fragmento de ligação deste, que preferencialmente se liga a um sítio alvo. Em uma modalidade, o agente de ligação direcionado é específico
25 para apenas um sítio alvo. Em outras modalidades, o agente de ligação direcionado é específico para mais que um sítio alvo. Em uma modalidade, o agente de ligação direcionado pode ser um anticorpo monoclonal e o sítio alvo pode ser um epitopo.

30 "Fragmentos de ligação" de um anticorpo são produzidos

por técnicas de DNA recombinante, ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Fragmentos de ligação incluem Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, e anticorpos de cadeia única. Um anticorpo diferente de um anticorpo "bi-específico" ou "bifuncional" deve ter cada um de seus sítios de ligação idêntico. Um anticorpo inibe substancialmente a adesão de um receptor a um contra-receptor quando um excesso de anticorpo reduz a quantidade de receptor ligado ao contra-receptor em pelo menos cerca de 20%, 40%, 60% ou 80%, e mais comumente mais que cerca de 85% (como medido em um ensaio de ligação competitiva *in vitro*).

Um anticorpo pode ser oligoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo enxertado em CDR, um anticorpo multi-específico, um anticorpo bi-específico, um anticorpo catalítico, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo totalmente humano, um anticorpo anti-idiotípico e anticorpos que podem ser rotulados em forma solúvel ou ligados, bem como fragmentos, variantes ou derivados destes, isoladamente ou em combinação com outras seqüências de aminoácidos fornecidas por técnicas conhecidas. Um anticorpo pode ser de qualquer espécie. O termo anticorpo também inclui a ligação de fragmentos dos anticorpos da invenção; fragmentos de exemplo incluem Fv, Fab, Fab', anticorpo de filamento único (svFC), de região variável dimérica (Diabody) e região variável estabilizada por dissulfeto (dsFv).

O termo "epitopo" inclui qualquer proteína determinante capaz de ligação específica a uma

imunoglobulina ou receptor de célula T. Determinantes epitópicos comumente consistem em agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e podem, mas nem
5 sempre, ter características estruturais tridimensionais específicas, bem como características específicas de carga. Um anticorpo se liga especificamente a um antígeno quando a constante de dissociação é $\leq 1 \mu\text{M}$, preferivelmente $\leq 100 \text{ nM}$, e mais preferivelmente $\leq 10 \text{ nM}$.

10 O termo "agente" é aqui usado para denotar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica, ou um extrato feito de materiais biológicos.

"Ativo" ou "atividade" em relação a polipeptídeo CD20
15 refere-se a uma porção de um polipeptídeo CD20 que tem uma atividade biológica ou imunológica de um polipeptídeo CD20 nativo. "Biológica" quando aqui usado refere-se a uma função biológica que resulta da atividade do polipeptídeo CD20 nativo. Uma atividade biológica preferida de CD20
20 inclui, por exemplo, proliferação de linfócitos B.

"Mamífero" quando aqui usado refere-se a qualquer animal que seja considerado um mamífero. Preferivelmente, o mamífero é humano.

A digestão de anticorpos com a enzima, papaína,
25 resulta em dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, conhecidos também como fragmentos "Fab", e um fragmento "Fc", que não tem atividade de ligação a antígeno mas tem uma capacidade de cristalizar. A digestão de anticorpos com a enzima, pepsina, resulta no fragmento
30 F(ab')_2 , em que os dois braços da molécula de anticorpo

permanecem ligados e compreendem dois sítios de ligação de antígeno. O fragmento $F(ab')_2$ tem a capacidade de cruzar o antígeno.

5 "Fv" quando aqui usado refere-se ao fragmento mínimo de um anticorpo que retém um sítio de reconhecimento de antígeno e sítio de ligação de antígeno.

"Fab" quando aqui usado refere-se a um fragmento de um anticorpo que compreende o domínio constante da cadeia leve e o domínio CH1 da cadeia pesada.

10 O termo "mAb" refere-se a anticorpo monoclonal.

"Lipossomo" quando aqui usado refere-se a uma pequena vesícula que pode ser útil para liberação de medicamentos que podem incluir o polipeptídeo CD20 da invenção ou anticorpos para tal polipeptídeo CD20 a um mamífero.

15 "Rótulo" ou "rotulado" como aqui usado refere-se à adição de uma porção detectável a um polipeptídeo, por exemplo, um radiomarcador, rótulo fluorescente, rótulo enzimático, rótulo quimioluminescente ou um grupo biotinilado. Radioisótopos ou radionuclídeos podem incluir
20 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , rótulos fluorescentes podem incluir rodamina, lantanida fósforo ou FITC, e rótulos enzimáticos podem incluir peroxidase de raiz forte, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina.

25 O termo "agente ou medicamento farmacêutico" como aqui usado refere-se a um composto químico ou composição capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando adequadamente administrado a um paciente. Outros termos da química são aqui usados de acordo com o uso convencional na
30 técnica, como exemplificado pelo "The McGraw-Hill

Dictionary of Chemical Terms" (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, São Francisco (1985)) (aqui incorporado por referência).

Como aqui usado, "substancialmente puro" significa que
5 uma espécie de objeto é a espécie predominante presente (ou
seja, em uma base molar ela é mais abundante que qualquer
outra espécie individual na composição), e preferivelmente
uma fração substancialmente purificada é uma composição em
que a espécie de objeto compreende pelo menos cerca de 50
10 por cento (em uma base molar) de todas as espécies
macromoleculares presentes. Geralmente, uma composição
substancialmente pura compreenderá mais de cerca de 80 por
cento de todas as espécies macromoleculares presentes na
composição, mais preferivelmente mais de cerca de 85%, 90%,
15 95% e 99%. Mais preferivelmente, uma espécie de objeto é
purificada até a homogeneidade essencial (espécies
contaminantes não podem ser detectadas na composição por
métodos convencionais de detecção), em que a composição
consiste essencialmente em uma única espécie
20 macromolecular.

"Citotoxicidade mediada por célula dependente de
anticorpo" e "ADCC" referem-se a uma reação mediada por
células em que células citotóxicas não específicas que
expressam receptores Fc de Ig (FcRs) (por exemplo, células
25 Natural Killer (NK), monócitos, neutrófilos e macrófagos)
reconhecem anticorpo ligado em uma célula alvo e
subseqüentemente causam a lise da célula alvo. As células
primárias para mediação de ADCC, células NK, expressam
FcγRIII apenas, enquanto os monócitos expressam FcγRI,
30 FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcRs em células

hematopoiéticas é resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Alum. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio *in vitro* de ADCC, como aquele descrito na Patente 5 U.S. No. 5.500.362, ou 5.821.337, pode ser realizado. Células efectoras úteis para tal ensaio incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células Natural Killer (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC de uma molécula de interesse pode ser 10 avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal como aquele revelado em Clynes e cols. *PNAS (LISA)* 95:652-656 (1988).

"Citotoxicidade dependente de complemento" e "CDC" referem-se ao mecanismo pelo qual os anticorpos realizam 15 sua função de matar células. Ela é iniciada pela ligação de C1q, um constituinte do primeiro componente do complemento, ao domínio Fc de Igs, IgG ou IgM, que estão em complexo com antígeno (Hughes-Jones, N.C., e B. Gardner. 1979. *Mol. Immunol.* 16:697). C1q é uma glicoproteína grande, 20 estruturalmente complexa, de ~410 kDa presentes no soro humano em uma concentração de 70 µg/ml (Cooper, N.R. 1985. *Adv. Immunol.* 37:151). Junto com duas proteases de serina, C1r e C1s, C1q forma o complexo C1, o primeiro componente do complemento. Pelo menos duas das cabeças globulares N- 25 terminais de C1q devem ser ligadas ao Fc de Igs para ativação de C1, dessa maneira para iniciação da cascata de complemento (Cooper, N.R. 1985. *Adv. Immunol.* 37:151).

"Ensaio de sangue total" usam sangue não fracionado como uma fonte de efetores naturais. O sangue contém 30 complemento no plasma, junto com efetores celulares que

expressam FcR, como células polimorfonucleares (PMNs) e células mononucleares (MNCs). Portanto, ensaios de sangue total permitem a avaliação simultânea da sinergia de mecanismos efetores de ADCC e CDC *in vitro*.

5 O termo "paciente" inclui animais e humanos.

Estrutura do Anticorpo

A unidade estrutural básica do anticorpo é conhecida por compreender um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de 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 amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos primariamente responsáveis pelo reconhecimento de antígeno. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante primariamente responsável pela função efetora. Cadeias leves humanas são classificadas como cadeias leves kapa e lambda. Cadeias pesadas são classificadas como mi, delta, gama, alfa ou épsilon, e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgA e IgE, respectivamente. Nas cadeias leve e pesada, as regiões variáveis e constantes são ligadas por uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada também incluindo uma região "D" de cerca de 10 ou mais aminoácidos. Veja, geralmente, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2^a ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado por referência em sua totalidade para todos os objetivos). As regiões variáveis de cada par de cadeia leve/pesada formam o sítio de ligação do anticorpo.

10
15
20
25

Portanto, um anticorpo intacto tem dois sítios de ligação. Exceto em anticorpos bifuncionais ou bi-

30

específicos, os dois sítios de ligação são o mesmo.

As cadeias exibem, todas, a mesma estrutura geral de regiões de estrutura (FR) relativamente conservadas ligadas por três regiões hipervariáveis, também chamadas regiões de determinação de complementaridade ou CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par são alinhadas pelas regiões de estrutura, permitindo a ligação a um epitopo específico. Do N-terminal ao C-terminal, as cadeias leve e pesada compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A designação de 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 e 1991)), ou Chothia & Lesk *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia e cols. *Nature* 342:878-883 (1989).

Um anticorpo bi-específico ou bifuncional é um anticorpo híbrido artificial que tem dois diferentes pares de cadeia pesada/leve e dois diferentes sítios de ligação. Anticorpos bi-específicos podem ser produzidos por vários métodos que incluem a fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Veja, por exemplo, Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny e cols. *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Anticorpos bi-específicos não existem na forma de fragmentos que têm um único sítio de ligação (por exemplo, Fab, Fab', e Fv).

Anticorpos humanos e humanização de anticorpos

Anticorpos humanos evitam alguns dos problemas associados a anticorpos que possuem regiões variáveis e/ou constantes de murídeo ou rato. A presença de tais proteínas derivadas de murídeo ou rato pode levar ao rápido clearance

dos anticorpos ou pode levar à geração de uma resposta imune contra o anticorpo por um paciente. Para evitar a utilização de anticorpos de derivados de murídeo e rato, anticorpos totalmente humanos podem ser gerados através da
5 introdução de lócus de anticorpo humano funcional em um roedor, outro mamífero ou animal de modo que o roedor, outro mamífero ou animal produza anticorpos totalmente humanos.

Um método para geração de anticorpos totalmente
10 humanos é através do uso de cepas XenoMouse® de camundongo que foram projetadas para conter fragmentos configurados de linha germinativa com tamanho de até e menos que 1.000 kb do lócus da cadeia pesada humana e lócus da cadeia leve kapa. As cepas XenoMouse® são disponíveis por Abgenix, Inc.
15 (Fremont, CA). Tais camundongos, então, são capazes de produzir moléculas de imunoglobulina e anticorpos humanos e são deficientes na produção de moléculas de imunoglobulina e anticorpos de murídeo. Tecnologias utilizadas para atingir o mesmo são reveladas em Pedido de Patente U.S. No.
20 de série 08/759.620, depositado em 3 de dezembro de 1996, Pedido Internacional de Patente No. WO 98/24893, publicado em 11 de junho de 1998, e WO 00/76310, publicado em 21 de dezembro de 2000, cuja revelação está aqui incorporada por referência. Veja também Mendez e cols. *Nature Genetics*
25 15:146-156 (1997), cuja revelação está aqui incorporada por referência.

Em geral, anticorpos produzidos pelos hibridomas fundidos eram cadeias pesadas de IgG1 ou IgG4 humana com cadeias leves totalmente humanas kapa ou lambda. Os
30 anticorpos também podem ser outros isotipos humanos,

incluindo cadeias pesadas IgG2. Os anticorpos possuem altas afinidades, tipicamente possuindo uma Kd de cerca de 10^{-6} até cerca de 10^{-12} M ou menos, quando medida contra células em técnicas de medição de afinidade baseadas em FACS. A
5 afinidade também pode ser medida por técnicas de fase sólida e de fase em solução. Em uma modalidade, os anticorpos aqui descritos ligam CD20 com uma Kd de menos que 12 nanomolar (nM) e induzem a apoptose dos linfócitos B. Em algumas modalidades, os anticorpos ligam CD20 com uma
10 Kd de menos que cerca de 10, 9, 8, 7, 6, 5 ou 4 nM.

Como será percebido, anticorpos anti-CD20 podem ser expressos em linhas de células diferentes de linhas de células de hibridoma. Seqüências que codificam anticorpos particulares podem ser usadas para transformar uma célula
15 hospedeira de mamífero adequada. A transformação pode ser por qualquer método para introdução de polinucleotídeos em uma célula hospedeira, incluindo, por exemplo, colocação do polinucleotídeo em um vírus (ou em um vetor viral) e transdução de uma célula hospedeira com o vírus (ou vetor)
20 ou por procedimentos de transfecção conhecidos na técnica, como exemplificado pelas Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 e 4.959.455 (cujas patentes são aqui incorporadas por referência). O procedimento de transformação usado depende do hospedeiro a ser
25 transformado. Métodos para introdução de polinucleotídeos heterólogos em células de mamíferos são bem conhecidos na técnica e incluem transfecção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação,
30 encapsulação do polinucleotídeo(s) em lipossomos, e

microinjeção direta do DNA no núcleo.

Linhas de células de mamíferos disponíveis como hospedeiros para expressão são bem conhecidas na técnica e incluem várias linhas de células imortalizadas disponíveis a partir da "American Tipo Culture Collection" (ATCC), incluindo, sem limitação, células de ovário de hamster da China (CHO), células HeLa, células de rim de filhote de hamster (BHK), células renais de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2), células 293 renais epiteliais humanas, e inúmeras outras linhas de células. Linhas de células de preferência particular são selecionadas através da determinação de quais linhas de células têm altos níveis de expressão e produzem anticorpos com propriedades de ligação de CD20 constitutiva.

Anticorpos anti-CD20 são úteis na detecção de CD20 em amostras de paciente e, portanto, são úteis como diagnósticos para estados de doença, como aqui descrito. Em adição, baseados em sua capacidade de induzir apoptose, despertar ADCC, e/ou induzir CDC (como demonstrado nos Exemplos abaixo), anticorpos anti-CD20 têm efeitos terapêuticos no tratamento de sintomas e condições que resultam da expressão de CD20 em células B. Em modalidades específicas, os anticorpos e métodos desta invenção relacionam-se ao tratamento de sintomas que resultam do crescimento de tumor induzido por CD20. Modalidades adicionais envolvem o uso dos anticorpos e métodos aqui descritos para tratar doenças neoplásicas, como NHL, incluindo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras e neoplasias de células B maduras, como

leucemia linfocítica crônica de células B (CLL), linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia pró-linfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células do manto (MCL), linfoma folicular (LF), incluindo LF de baixo grau, grau intermediário e de alto grau, linfoma de centro do folículo cutâneo, linfoma B de zona marginal (tipo MALT, nodal e tipo esplênico), leucemia de células pilosas, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmática, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante, macroglobulinemia de Waldenström, e linfoma de célula grande anaplásico (ALCL). Além disso, exemplos incluem B-NHL refratário ou de recidiva após terapia com Rituximab. Doença imunes incluem doença de Crohn, Granulomatose de Wegener, psoríase, artrite psoriática, dermatite, escleroderma e esclerose sistêmica, doença inflamatória do intestino (IBD), colite ulcerativa, síndrome da angústia respiratória, meningite, encefalite, uveíte, glomerulonefrite, eczema, asma, aterosclerose, deficiência de adesão de leucócitos, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil, doença de Reiter, doença de Behcet, nefrite de complexo imune, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenias imune-mediadas, como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia gravis, nefrite de lúpus, lúpus eritematoso disseminado, artrite reumatóide (RA), dermatite atópica, pênfigo, doença de Grave, tireoidite de Hashimoto, síndrome de Omenn, insuficiência renal crônica, mononucleose infecciosa aguda, doenças associadas ao HIV e herpes vírus.

Distúrbios adicionais incluem síndrome da angústia respiratória aguda severa e coriorretinite. Outros exemplos são doenças e distúrbios causados por infecção de células B com vírus, como o vírus de Epstein Barr (EBV).

5 Seqüências de anticorpo

Modalidades da invenção incluem os anticorpos específicos anti-CD20 listados abaixo na Tabela 1. Essa tabela relata o número de identificação de cada anticorpo anti-CD20, junto com o número Id. de Seq. das regiões variáveis dos genes de cadeia pesada e cadeia leve correspondentes.

Cada anticorpo recebeu um número de identificação que inclui dois ou três números separados por um ou dois pontos decimais. Em alguns casos, apenas dois números de identificação separados por um ponto decimal são listados. No entanto, em alguns casos, vários clones de um anticorpo foram preparados. Embora os clones tenham o ácido nucléico e seqüências de aminoácidos idênticos aos da seqüência parente, eles também podem ser listados separadamente, com o número de clone indicado pelo número à direita de um segundo ponto decimal. Assim, por exemplo, o ácido nucléico e seqüências de aminoácidos do anticorpo 1.2 são idênticos às seqüências de anticorpo 1.2.1, 1.2.2 e 1.2.3.

TABELA 1

ID. de mAb No.:	Seqüência	Id. de Seq. N°:
1.1.2	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	1
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	2

	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	3
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	4
1.10.3.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	5
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	6
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	7
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	8
1.11.3.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	9
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	10
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	11
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	12
1.12.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	13
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	14
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	15
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	16
1.13.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	17

	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	18
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	19
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	20
1.2.1.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	21
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	22
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	23
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	24
1.4.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	25
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	26
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	27
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	28
1.5.3	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	29
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	30
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	31
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	32

1.6.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	33
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	34
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	35
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	36
1.7.1.	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	37
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	38
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	39
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	40
1.9.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	41
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	42
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	43
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	44
2.1.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	45
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	46
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	47

	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	48
2.2.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	49
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	50
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	51
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	52
2.4.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	53
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	54
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	55
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	56
3.1.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	57
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	58
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	59
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	60
3.2.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	61
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	62

	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	63
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	64
3.31	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	65
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	66
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	67
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	68
3.4.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	69
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	70
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	71
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	72
3.7.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	73
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	74
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	75
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	76
4.2.1.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	77

	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	78
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	79
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	80
4.6.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	81
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	82
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	83
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	84
6.3.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	85
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	86
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	87
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	88
7.1.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	89
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	90
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	91

	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	92
7.17.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	93
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	94
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	95
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	96
7.18.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	97
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	98
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	99
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	100
7.21.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	101
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	102
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	103
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	104
7.23.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	105
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	106

7.23.1.1 k2	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	107
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	108
7.24.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	109
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	110
7.24.1.1 k2	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	111
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	112
7.26.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	113
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	114
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	115
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	116
7.28.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	117
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	118
7.28.1.1 k2	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	119
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	120
7.7.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	121

	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	122
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	123
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	124
7.8.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	125
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	126
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	127
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	128
7.9.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	129
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	130
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	131
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	132
8.2.1	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada	133
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia pesada	134
	Seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve	135
	Seqüência de aminoácidos que codifica a região variável da cadeia leve	136

Administração e formulações terapêuticas

Anticorpos anti-CD20 podem ter efeitos terapêuticos no tratamento de sintomas e condições relacionados à expressão de CD20. Por exemplo, os anticorpos podem induzir apoptose das células que expressam CD20, dessa forma inibindo o crescimento do tumor, ou os anticorpos podem ser associados a um agente e liberar uma toxina letal a uma célula visada. Em adição, os anticorpos anti-CD20 são úteis como diagnósticos para os estados de doença, especialmente doenças neoplásicas e imunes.

Se desejado, o isotipo de um anticorpo anti-CD20 pode ser trocado, por exemplo, para tomar vantagem de uma propriedade biológica de um diferente isotipo. Por exemplo, em algumas circunstâncias, pode ser desejável, junto com a geração de anticorpos como anticorpos terapêuticos contra CD20, que os anticorpos sejam capazes de fixar complemento e de participar na citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Há inúmeros isotipos de anticorpos que são capazes do mesmo, incluindo, sem limitação, os seguintes: IgM de murídeo, IgG2a de murídeo, IgG2b de murídeo, IgG3 de murídeo, IgM humana, IgA humana, IgG1 humana e IgG3 humana. Em outras modalidades, pode ser desejável, junto com a geração de anticorpos como anticorpos terapêuticos contra CD20, que os anticorpos sejam capazes de ligar receptores Fc em células efetoras e de participar na citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC). Há inúmeros isotipos de anticorpos que são capazes do mesmo, incluindo, sem limitação, os seguintes: IgG2a de murídeo, IgG2b de murídeo, IgG3 de murídeo, IgG1 humana e IgG3 humana. Deve-se observar que os anticorpos que são gerados não precisam

possuir inicialmente tal isotipo, mas, ao contrário, o anticorpo como gerado pode possuir qualquer isotipo e o anticorpo pode ter o isotipo trocado posteriormente usando técnicas convencionais que são bem conhecidas na técnica.

5 Tais técnicas incluem o uso de técnicas recombinantes diretas (veja, por exemplo, Patente U.S. No. 4.816.397), técnicas de fusão célula-célula (veja, por exemplo, Patente U.S. Nos. 5.916,771 e 6,207,418), entre outros.

Por via de exemplo, os anticorpos anti-CD20 aqui
10 discutidos são anticorpos totalmente humanos. Se um anticorpo possui ligação desejada a CD20, ele pode ter o isotipo facilmente trocado para gerar um isotipo de IgM humana, IgG1 humana, ou IgG3 humana, embora ainda possuindo a mesma região variável (que define a especificidade do
15 anticorpo e um pouco de sua afinidade). Tal molécula seria então capaz de fixar complemento e de participar na CDC e/ou ser capaz de se ligar a receptores Fc em células efectoras e de participar em ADCC.

Na técnica de fusão célula-célula, é preparada uma
20 linha de células de mieloma, célula CHO ou outra linha de células que possua uma cadeia pesada com qualquer isotipo desejado, e é preparada uma linha de células de mieloma, célula CHO ou outra linha de células que possua uma cadeia leve. Tais células podem, posteriormente, ser fundidas, e
25 uma linha de células que expressa um anticorpo intacto pode ser isolada.

Portanto, uma vez que são gerados candidatos de anticorpo que estão de acordo com os atributos "estruturais" desejados como acima discutido, eles podem
30 ser geralmente fornecidos com pelo menos alguns dos

atributos "funcionais" desejados através da troca de isotipo.

Modalidades da invenção incluem formulações farmacêuticas estéreis de anticorpos anti-CD20 que são
5 úteis como tratamentos para doenças. Tais formulações podem induzir apoptose de linfoma de células B, dessa forma tratando, de forma eficaz, condições patológicas em que, por exemplo, a expressão de CD20 é anormalmente elevada ou células que expressam CD20 medeiam estados de doença.
10 Anticorpos anti-CD20 preferivelmente possuem afinidade adequada para ligar especificamente CD20, e preferivelmente têm uma duração de ação adequada para permitir dosagem infreqüente em humanos. Uma duração de ação prolongada permitirá esquemas de dosagem menos freqüentes e mais
15 convenientes por vias parenterais alternativas como injeção subcutânea ou intramuscular.

Formulações estéreis podem ser criadas, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéreis, antes ou após liofilização e reconstituição do anticorpo. O
20 anticorpo comumente será estocado em forma liofilizada ou em solução. Composições terapêuticas de anticorpo geralmente são colocadas em um recipiente que tem uma porta de acesso estéril, por exemplo, uma bolsa ou frasco de solução intravenosa que tem um adaptador que permite a
25 recuperação da formulação, como um tampo perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

A via de administração do anticorpo está de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, injeção ou infusão por via intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular,
30 intra-ocular, intra-arterial, intratecal, inalação ou

intralesional, por sistemas de liberação sustentada como abaixo notado. O anticorpo é preferivelmente administrado continuamente por infusão ou por injeção bolus.

Uma quantidade eficaz de anticorpo a ser empregada
5 terapeuticamente dependerá, por exemplo, dos objetivos terapêuticos, da via de administração, e da condição do paciente. Portanto, é preferível que o terapeuta titule a dosagem e modifique a via de administração como necessário para obter o efeito terapêutico ótimo. Tipicamente, o
10 clínico administrará o anticorpo até que seja atingida uma dosagem que obtenha o efeito desejado. O progresso dessa terapia é facilmente monitorado por ensaios convencionais ou pelos ensaios aqui descritos.

Anticorpos, como aqui descritos, podem ser preparados
15 em uma mistura com um veículo farmacêuticamente aceitável. Essa composição terapêutica pode ser administrada por via intravenosa ou através do nariz ou pulmão, preferivelmente como um líquido ou aerossol em pó (liofilizada). A composição também pode ser administrada por via parenteral
20 ou subcutânea como desejado. Quando administrada por via sistêmica, a composição terapêutica deve ser estéril, livre de pirogênio e em uma solução parenteralmente aceitável com atenção ao pH, isotonicidade e estabilidade. Essas condições são conhecidas por aqueles habilitados na
25 técnica. De forma breve, formulações de dosagem dos compostos aqui descritos são preparadas para estocagem ou administração por mistura do composto que tem o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes fisiologicamente aceitáveis. Tais materiais
30 são não tóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações

empregadas, e incluem tampões como TRIS HCl, fosfato, citrato, acetato e outros sais de ácidos orgânicos; antioxidantes como ácido ascórbico; peptídeos de baixo peso molecular (menos que cerca de dez resíduos) como
5 poliariginina; proteínas, como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, como polivinilpirrolidinona; aminoácidos, como glicina, ácido glutâmico, ácido aspártico ou arginina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos, incluindo celulose ou
10 seus derivados, glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, como EDTA; álcoois de açúcar, como manitol ou sorbitol; contra-íons, como sódio e/ou tensoativos não iônicos, como TWEEN, PLURONICS ou polietilenoglicol.

Composições estéreis para injeção podem ser formuladas
15 de acordo com prática farmacêutica convencional, como descrito em Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (20ª ed, Lippincott Williams & Wilkens Publishers (2003)). Por exemplo, a dissolução ou suspensão do composto ativo em um veículo como água ou óleo vegetal de ocorrência natural
20 como gergelim, amendoim ou algodão, ou um veículo graxo sintético como oleato de etila ou outros, pode ser desejada. Tampões, conservantes, antioxidantes e outros podem ser incorporados de acordo com prática farmacêutica aceita.

Exemplos adequados de preparações de liberação
25 sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros sólidos hidrofóbicos que contêm o polipeptídeo, cujas matrizes estão na forma de artigos modelados, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada
30 incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-

hidroxietilmetacrilato) como descrito por Langer e cols.,
J. Biomed Mater. Res., (1981) 15:167-277 e Langer, *Chem.*
Tech., (1982) 12:98-105, ou poli(vinilálcool)),
polilactídeos (Pat. U.S. No. 3.773.919, EP 58.481),
5 copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato
(Sidman e cols., *Biopolimers*, (1983) 22:547-556), acetato
de etileno-vinil não degradáveis (Langer e cols., *supra*),
copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis
como LUPRON DepotTM (microesferas injetáveis compostas de
10 copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de
leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP
133,988).

Embora polímeros como acetato de etileno-vinila e
ácido láctico-ácido glicólico permitam a liberação de
15 moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam
proteínas por períodos de tempo mais curtos. Quando
proteínas encapsuladas permanecem no corpo por um longo
tempo, elas podem desnaturar ou se agregar como um
resultado de exposição à umidade a 37°C, resultando em uma
20 perda de atividade biológica e possíveis mudanças na
imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser planejadas
para estabilização de proteína dependendo do mecanismo
envolvido. Por exemplo, se for descoberto que o mecanismo
de agregação é formação de ligação intermolecular S-S
25 através de intercâmbio de dissulfeto, a estabilização pode
ser atingida por modificação de resíduos de sulfidril,
liofilização de soluções ácidas, controle do conteúdo de
umidade, uso de aditivos adequados, e desenvolvimento de
composições de matriz poliméricas específicas.

30 Composições de liberação sustentada também incluem

preparações de cristais do anticorpo suspensas em formulações adequadas capazes de manter os cristais em suspensão. Essas preparações quando injetadas por via subcutânea ou intraperitoneal podem produzir um efeito de liberação sustentada. Outras composições também incluem anticorpos lipossomicamente aprisionados. Lipossomos que contêm tais anticorpos são preparados por métodos conhecidos por si: Pat. U.S. No. DE 3.218.121; Epstein e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1985) 82:3688-3692; Hwang e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1980) 77:4030-4034; EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; 142.641; Pedido de Patente Japonesa 83-118008; Pat. U.S. Nos. 4.485.045 e 4.544.545; e EP 102.324.

A dosagem da formulação de anticorpo para um dado paciente será determinada pelo profissional médico levando em consideração vários fatores conhecidos por modificar a ação de medicamentos incluindo severidade e tipo de doença, peso corporal, sexo, dieta, tempo e via de administração, outras medicações e outros fatores clínicos relevantes. Dosagens terapeuticamente eficazes podem ser determinadas por métodos *in vitro* ou *in vivo*.

Uma quantidade eficaz dos anticorpos, aqui descritos, a serem empregados terapeuticamente dependerá, por exemplo, dos objetivos terapêuticos, da via de administração, e da condição do paciente. Portanto, é preferível que o terapeuta titule a dosagem e modifique a via de administração como necessário para obter o efeito terapêutico ótimo. Uma dosagem diária típica deve variar de cerca de 0,001 mg/kg até 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores acima mencionados. Tipicamente, o clínico

administará o anticorpo terapêutico até que seja atingida uma dosagem que alcance o efeito desejado. O progresso dessa terapia é facilmente monitorado por ensaios convencionais ou como aqui descrito.

5 Deve-se observar que a administração de entidades terapêuticas de acordo com as composições e métodos nesta invenção será administrada com veículos, excipientes e outros agentes adequados que são incorporados em formulações para fornecer melhor transferência, liberação, 10 tolerância e outros. Essas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, pomadas, geléias, ceras, óleos, lipídeos, vesículas que contêm lipídeos (catiônicos ou aniônicos) (como Lipofectin™), conjugados de DNA, pastas de absorção anidras, emulsões óleo em água e água em óleo, 15 emulsões carbowax (polietileno glicóis de vários pesos moleculares), géis semi-sólidos, e misturas semi-sólidas que contêm carbowax. Qualquer uma das misturas anteriores pode ser adequada em tratamentos e terapias de acordo com a presente invenção, desde que o ingrediente ativo na 20 formulação não seja inativado pela formulação e a formulação seja fisiologicamente compatível e tolerável com a via de administração. Veja também Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 25 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." *Int. J. Pharm.* 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." *J Pharm Sci* .89(8):967-78 (2000), Powell e cols. "Compendium of 30 excipients for parenteral formulations" *PDA J Pharm Sci*

Technol. 52:238-311 (1998) e as citações neste pedido para informação adicional relacionada a formulações, excipientes e veículos bem conhecidos de químicos farmacêuticos.

Projeto e geração de outros terapêuticos

5 De acordo com a presente invenção e baseado na atividade dos anticorpos que são produzidos e caracterizados nesta invenção com relação a CD20, o projeto de outras modalidades terapêuticas é facilitado e revelado por pessoa habilitada na técnica. Tais modalidades incluem,
10 sem limitação, anticorpos terapêuticos avançados, como anticorpos bi-específicos, imunotoxinas, terapêuticos radio-rotulados, e domínios V de anticorpo único, agente de ligação semelhante a anticorpo baseado em outros diferentes moldes (scaffolds) da região V, geração de terapêuticos
15 peptídicos, terapias gênicas, particularmente intracorpos, terapêuticos anti-senso e moléculas pequenas.

Em conexão com a geração de terapêuticos de anticorpo avançado, em que a fixação do complemento é um atributo desejável, pode ser possível evitar a dependência do
20 complemento para morte celular através do uso de bi-específicos, imunotoxinas ou radiomarcadores, por exemplo.

Por exemplo, podem ser gerados anticorpos bi-específicos que compreendem (i) dois anticorpos, um com uma especificidade para CD20 e um outro com uma segunda
25 molécula, que são conjugados juntos, (ii) um anticorpo único que tem uma cadeia específica para CD20 e uma segunda cadeia específica para uma segunda molécula, ou (iii) um anticorpo de cadeia única que tem especificidade para CD20 e para a outra molécula. Tais anticorpos bi-específicos
30 podem ser gerados com o uso de técnicas que são bem

conhecidas; por exemplo, junto com (i) e (ii) veja, por exemplo, Fanger e cols. *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) e Wright e Harris, supra. e junto com (iii) veja, por exemplo, Traunecker e cols. *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52
5 (1992). Em cada caso, a segunda especificidade pode ser feita como desejado. Por exemplo, a segunda especificidade pode ser feita para os receptores de ativação de cadeia pesada, incluindo, sem limitação, CD16 ou CD64 (veja, por exemplo, Deo e cols. 18:127 (1997)) ou CD89 (veja, por
10 exemplo, Valerius e cols. *Blood* 90:4485-4492 (1997)).

Anticorpos também podem ser modificados para agir como imunotoxinas utilizando técnicas que são bem conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Vitetta *Inununol Today* 14:252 (1993). Veja também Patente U.S. No. 5.194.594. Em conexão
15 com a preparação de anticorpos radio-rotulados, tais anticorpos modificados também podem ser facilmente preparados utilizando técnicas que são bem conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Junghans e cols. em *Cancer chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edition, Chafner e
20 Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Veja também Patentes U.S. Nos. 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35.500), 5.648.471, e 5.697.902. Cada uma das imunotoxinas e moléculas radio-rotuladas devem matar células que expressam o domínio de oligomerização de subunidade de
25 enzima multimérica desejado. Em algumas modalidades, é fornecida uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz do anticorpo em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável ou diluente.

Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CD20 é
30 ligado a um agente (por exemplo, radioisótopo, composição

farmacêutica ou uma toxina). Preferivelmente, tais anticorpos podem ser usados para o tratamento de doenças, e tais doenças podem se relacionar com células que expressam CD20 ou células que superexpressam CD20. Por exemplo, é contemplado que o medicamento possui a propriedade farmacêutica selecionada do grupo de agentes antimitótico, de alquilação, antimetabólito, anti-angiogênese, apoptótico, alcalóide, COX-2, e antibióticos e combinações destes. O medicamento pode ser selecionado do grupo de mostardas de nitrogênio, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosouréias, triazenos, análogos de ácido fólico, antraciclinas, taxanos, inibidores da COX-2, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabólitos, antibióticos, enzimas, epipodofilotoxinas, complexos de coordenação de platina, alcalóides da vinca, uréias substituídas, derivados de metil hidrazina, supressores adrenocorticais, antagonistas, endostatina, taxóis, camptotecinas, oxaliplatina, doxorubicinas e seus análogos, e uma combinação destes.

Exemplos de toxinas também incluem gelonina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE), PE40, PE38, toxina diftérica, ricina, ricina, abrina, alfa toxina, saporina, ribonuclease (RNase), DNase I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de *pokeweed*, gelonina, endotoxina de *Pseudomonas*, bem como derivados, combinações e modificações destes.

Exemplos de radioisótopos incluem gama-emissores, pósitron-emissores, e emissores de raios X que podem ser usados para localização e/ou terapia, e beta-emissores e alfa-emissores que podem ser usados para terapia. Os radioisótopos descritos previamente úteis para o

diagnóstico, prognóstico e graduação são também úteis para terapêutica. Exemplos não limitantes de agentes anticâncer ou antileucemia incluem antraciclinas como doxorubicina (adriamicina), daunorrubicina (daunomicina), idarrubicina, 5 detorrubicina, carminomicina, epirubicina, esorrubicina, e morfolino e derivados substituídos, combinações e modificações destes. Exemplos de agentes farmacêuticos incluem cis-platina, taxol, caliqueamicina, vincristina, citarabina (Ara-C), ciclofosfamida, prednisona, 10 daunorrubicina, idarrubicina, fludarabina, clorambucil, interferon alfa, hidroxiuréia, temozolomida, talidomida e bleomicina, e derivados, combinações e modificações destes. Preferivelmente, o anticâncer ou antileucemia é doxorubicina, morfolinodoxorubicina ou 15 morfolinodaunorrubicina.

Como será observado por pessoa de habilidade na técnica, nas modalidades acima, embora os valores de afinidade possam ser importantes, outros fatores podem ser tão importantes ou mais, dependendo da função particular do 20 anticorpo. Por exemplo, para uma imunotoxina (toxina associada com um anticorpo), o ato de ligação do anticorpo ao alvo pode ser útil; no entanto, em algumas modalidades, é a internalização da toxina na célula que é o resultado final desejado. Como tal, anticorpos com uma alta 25 internalização por cento podem ser desejáveis nessas situações. Assim, em uma modalidade, anticorpos com uma alta eficiência em internalização são contemplados. Uma alta eficiência de internalização pode ser medida como percentagem de anticorpo internalizado, e pode ser de um 30 valor baixo até 100%. Por exemplo, em modalidades

variáveis, 0,1-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-45, 45-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-99 e 99-100% podem ser uma alta eficiência. Como será percebido por pessoa habilitada na técnica, a eficiência desejável pode ser diferente em diferentes modalidades, dependendo, por exemplo, do agente associado, da quantidade de anticorpo que pode ser administrada a uma área, dos efeitos colaterais do complexo anticorpo-agente, do tipo (por exemplo, tipo de câncer) e severidade do problema a ser tratado.

10 Em outras modalidades, os anticorpos aqui revelados fornecem um kit de ensaio para a detecção de expressão de CD20 em tecidos de mamíferos ou células para rastrear a doença ou distúrbio associado com mudanças na expressão de CD20. O kit compreende um anticorpo que liga CD20 e meios
15 para indicação da reação do anticorpo com o antígeno, se presente.

Em algumas modalidades, é fornecido um artigo de manufatura que compreende um recipiente, que compreende uma composição que contém um anticorpo anti-CD20, e uma
20 inserção de embalagem ou rótulo que indica que a composição pode ser usada para tratar doença mediada por expressão de CD20. Preferivelmente, um mamífero e, mais preferivelmente, um humano, recebe o anticorpo anti-CD20.

Combinações

25 O tratamento antineoplásico aqui definido pode ser aplicado como uma terapia única ou pode envolver, em adição aos compostos da invenção, cirurgia convencional, transplantes de medula óssea e de célula-tronco periférica ou radioterapia ou quimioterapia. Tal quimioterapia pode
30 incluir uma ou mais das seguintes categorias de agentes

antitumor:

(i) agentes citotóxicos como fludarabina, 2-clorodesoxiadenosina, clorambucil ou doxorrubicina, e combinação destes como Fludarabina + ciclofosfamida, CVP: 5 ciclofosfamida + vincristina + prednisona, ACVBP: doxorrubicina + ciclofosfamida + vindesina + bleomicina + prednisona, CHOP: ciclofosfamida + doxorrubicina + vincristina + prednisona, CNOP: ciclofosfamida + mitoxantrona + vincristina + prednisona, m-BACOD: 10 metotrexato + bleomicina + doxorrubicina + ciclofosfamida + vincristina + dexametasona + leucovorin., MACOP-B: metotrexato + doxorrubicina + ciclofosfamida + vincristina + dose fixa de prednisona + bleomicina + leucovorin, ou ProMACE CytaBOM: prednisona + doxorrubicina + 15 ciclofosfamida + etoposida + citarabina + bleomicina + vincristina + metotrexato + leucovorin.

(ii) agentes que inibem a invasão da célula cancerosa (por exemplo, inibidores de metaloproteinase como marimastat e inibidores da função de receptor de ativador 20 de uroquinase plasminogênio);

(iii) inibidores de fator de crescimento ou função de sinalização de sobrevivência, por exemplo, tais inibidores incluem anticorpos de fator de crescimento (por exemplo, anticorpos direcionados contra BlyS), anticorpos 25 de receptor de fator de crescimento (por exemplo, anticorpos direcionados contra CD40 ou receptores TRAIL, TRAILR1 e TRAILR2), inibidores de famesil transferase ou inibidores de tirosina quinase e inibidores de serina/treonina quinase, inibidores de MEK, inibidores de 30 proteínas de sinalização de sobrevivência como Bcl-2, Bcl-

XL por exemplo ABT-737;

(iv) agentes anti-angiogênicos como aqueles que inibem os efeitos de fator de crescimento endotelial vascular, (por exemplo, o anticorpo de fator anti-crescimento de
5 célula endotelial vascular bevacizumab [AvastinTM], anticorpo de receptor de fator anti- crescimento endotelial vascular como anticorpos anti-KDR e anticorpos anti-flt1, compostos como aqueles revelados nos Pedidos de Patente Internacional WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/3285, WO
10 98/13354, WO00/47212 e WO01/32651) e compostos que trabalham por outros mecanismos (por exemplo, linomida, inibidores de função avb3 de integrina e angiostatina);

(v) agentes de dano vascular como Combretastatin A4 e compostos revelados nos Pedidos de Patente Internacional WO
15 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 e WO 02/08213;

(vi) terapias anti-senso, por exemplo, aquelas que são direcionadas aos alvos acima listados, como G-3139 (Genasense), um anti bcl2 anti-senso;

20 (vii) abordagens de terapia gênica, incluindo, por exemplo, abordagens para substituir genes aberrantes como p53 aberrante ou BRCA1 ou BRCA2, GDEPT aberrante (terapia de pró-fármaco de enzima direcionada a gene), abordagens como aquelas que usam citosina desaminase, timidina quinase
25 ou uma enzima nitroreductase bacteriana e abordagens para aumentar a tolerância do paciente a quimioterapia ou radioterapia como terapia de gene de resistência a multi medicamentos; e

(viii) abordagens de imunoterapia, incluindo, por
30 exemplo, tratamento com Alemtuzumab (campath-1HTM), um

anticorpo monoclonal direcionado a CD52, ou tratamento com anticorpos direcionados a CD22, abordagens *ex vivo* e *in vivo* para aumentar a imunogenicidade de células tumorais do paciente, transfecção com citocinas como interleucina 2, 5 interleucina 4 ou fator de estimulação de colônia de macrófago granulócito, abordagens para diminuir anergia de célula T como tratamento com anticorpos monoclonais que inibem a função de CTLA-4, abordagens com o uso de células imunes transfectadas como células dendríticas transfectadas por citocina, abordagens que usam linhas de células tumorais transfectadas por citocina, e abordagens que usam anticorpos anti-idiotípicos.

(ix) inibidor de degradação de proteína como inibidor de proteassomo como Velcade (bortezomid) .

15 (x) abordagens de terapêuticos bioterapêuticos, por exemplo, aqueles que usam peptídeos ou proteínas (como anticorpos ou construções de domínio de receptor externo solúvel) que seqüestram ligantes de receptor, bloqueiam a ligação de ligante ao receptor ou diminuem a sinalização do 20 receptor (por exemplo, devido a melhor degradação de receptor ou níveis diminuídos de expressão)

Em uma modalidade da invenção, os tratamentos antineoplásicos da invenção são combinados com agentes que inibem os efeitos de fator de crescimento vascular 25 endotelial (VEGF) (por exemplo, o anticorpo anti-fator de crescimento vascular de célula endotelial bevacizumab (Avastine), anticorpos anti-receptor de fator de crescimento vascular endotelial como anticorpos anti-KDR e anticorpos anti-flt1, compostos como aqueles revelados nos 30 Pedidos de Patente Internacional WO 97/22596, WO 97/30035,

WO 97/3285, WO 98/13354, WO 00/47212 e WO 01/32651) e compostos que trabalham por outros mecanismos (por exemplo, linomida, inibidores de função de integrina avb3 e angiostatina). Em outra modalidade da invenção, os

5 tratamentos anti-angiogênicos da invenção são agentes combinados que inibem a atividade de tirosina quinase do receptor de fator de crescimento vascular endotelial, KDR (por exemplo AZD2171 ou AZD6474). Detalhes adicionais sobre AZD2171 podem ser encontrados em Wedge e cols. (2005)

10 *Cancer Research*. 65(10):4389-400. Detalhes adicionais sobre AZD6474 podem ser encontrados em Ryan & Wedge (2005) *British Journal of Cancer*. 92 Sup.1 1:S6-13. Ambas as publicações são aqui incorporadas por referência em suas totalidades. Em outra modalidade da invenção, os anticorpos

15 totalmente humanos 1.1.2, 1.5.3 e 2.1.2 são combinados isoladamente ou em combinação com Avastin™, AZD2171 ou AZD6474.

Tal tratamento conjunto pode ser realizado por via de dosagem simultânea, seqüencial ou separada dos componentes

20 individuais do tratamento. Tais produtos de combinação empregam os compostos desta invenção, ou sais farmacêuticamente aceitáveis destes, na faixa de dosagem aqui descrita anteriormente e o outro agente farmacêuticamente ativo em sua faixa de dosagem aprovada.

25 EXEMPLOS

Os exemplos a seguir, que incluem os experimentos conduzidos e resultados atingidos, são fornecidos para objetivos ilustrativos apenas, e não devem ser interpretados como limitantes dos ensinamentos aqui

30 apresentados.

EXEMPLO 1

IMUNIZAÇÃO E TITULAGEM

Clonagem de plasmídeo de CD20 humano

RNA total foi isolado de células RAJI com o uso de
5 solução de isolamento de RNA RNazol B (Tel-Test, INC,
Friendswood, TX) de acordo com as instruções do fabricante,
e quantificado por absorção de ultravioleta a 260 nm (Bio-
RAD smartspec™ 3000). Dois microgramas de RNA total foram
iniciados aleatoriamente com kit de síntese de cDNA de
10 filamento único (GIBCO-BRL) de acordo com as instruções do
fabricante. cDNA de filamento único foi amplificado com o
uso de Taq DNA polimerase (QIAGEN, Valencia, CA) com
iniciadores de oligonucleotídeo (Operon, Huntsville, AL)
como se segue:

15 Iniciador adiante: 5'-TCAGGAGTTTTGAGAGCAAATG-3' (Id.
de Seq. N°: 137) e

Iniciador reverso: 5'-AACAGAAGAAATCACTTAAGGAG-3' Id.
de Seq. N°: 138)

As condições de PCR foram como se segue: uma
20 desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de
94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1
minuto, e extensão de um ciclo por 10 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese de
gel de agarose, isolados com o uso de kit de extração em
25 gel Qiaquick (QIAGEN, Valencia, CA) e ligados com T4 ligase
(New England Biolabs, Beverly, MA) em vetor de expressão TA
eucariótico bidirecional pCR 3.1 (Invitrogen, Carlsbad,
CA). Cepa Top10F' de *Escherichia coli* foi usada para
transformação. Clones resistentes a ampicilina foram
30 propagados em bactéria e avaliados para a presença da

inserção de 1 kb por digestão com EcoRI (New England Biolabs, Beverly, MA). Todos os produtos de amplificação por PCR foram seqüenciados para assegurar corretas seqüências de DNA com o uso de métodos de terminadores BigDye com Analisador Genético 3100 (PE Biosystems, Foster City, CA).

Células e transfecção

Células HEK 293F e CHO K1 cresceram em meio DMEM/F12 (50/50 mix) suplementado com 10% FBS, 2 mM L-Glutamina, 50 µM BME, 100 unidades de Penicilina-g/ml, 100 unidades de MCG estreptomicina/ml. Um plasmídeo humano CD20/pCR3.1 foi transfectado em células HEK 293F e CHO K1 com o uso de Reagente LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Transfecção prosseguiu por 48 horas seguida por seleção com 1 mg/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) por duas semanas. Clones resistentes estáveis G418 foram corados com anticorpo monoclonal primário de camundongo anti-CD20 humano (BD) seguido por IgG anti-camundongo de cabra conjugado (CalTag Laboratories, Burlingame, CA) e analisados por FACS com FACS Vantage (BD, Franklin Lakes, NJ).

Imunização

CD20 expressa em linhas de células Ramos de câncer humano, células Daudi e CD20 CHO foi usada como um antígeno. Anticorpos monoclonais contra CD20 foram desenvolvidos por imunização seqüencial de camundongo XenoMouse® (XenoMouse strains: XM3B3:IgG1K, XM3B3L3:IgG1KL, XM3B3L:IgG1L, XM3 C-1 : IgG4K, XM3C-1L3 :IgG4KL, e XM3C-1L:IgG4L, Abgenix, Inc. Fremont, CA). Os animais XenoMouse foram imunizados na pata traseira para todas as injeções

por meio convencional. O volume total de cada injeção foi de 50 µl por camundongo, 25 µl por pata traseira.

EXEMPLO 2

RECUPERAÇÃO DE LINFÓCITOS, ISOLAÇÃO DE CÉLULAS B, FUSÃO E
5 GERAÇÃO DE HIBRIDOMAS

Camundongos imunizados selecionados foram sacrificados por deslocamento cervical e os linfonodos de drenagem foram colhidos e separados de cada grupo. As células linfóides foram dissociadas por moagem em DMEM para liberar as
10 células dos tecidos, e as células foram suspensas em DMEM. As células foram contadas, e 0,9 ml DMEM por 100 milhões de linfócitos foi adicionado ao pélete de células para ressuspender as células levemente, mas completamente. Com o uso de 100 µl de glóbulos magnéticos CD90+ por 100 milhões
15 de células, as células foram rotuladas por incubação das células com os glóbulos magnéticos a 4°C por 15 minutos. A suspensão de células magneticamente rotuladas contendo até 10^8 células positivas (ou até 2×10^9 células totais) foi carregada em uma coluna LS+, e a coluna lavada com DMEM. O
20 efluente total foi coletado como a fração negativa CD90 (a maior parte dessas células eram células B).

Uma fusão foi realizada por mistura de células B enriquecidas lavadas da etapa acima e células não secretoras de mieloma P3X63Ag8.653 adquiridas de ATCC (cat.
25 no. CRL 1580) (Kearney e cols, *J. Immunol.* 123, 1979, 1548-1550) em uma proporção de 1:1. A mistura de células foi levemente peletizada por centrifugação a 800 x g. Depois da remoção completa do sobrenadante, as células foram tratadas com 2-4 mL de solução de Pronase (CalBiochem, cat. # 53702;
30 0,5 mg/mL in PBS) por não mais que 2 minutos. Então, 3-5 ml

de FBS foram adicionados para interromper a atividade da enzima e a suspensão foi ajustada a 40 mL de volume total com o uso de solução de fusão de eletro células, ECFS (0,3 M Sacarose, Sigma, Cat# S7903, 0,1 mM Acetato de magnésio, 5 Sigma, Cat# M2545, 0,1 mM Acetato de cálcio, Sigma, Cat# C4705). O sobrenadante foi removido após centrifugação e as células foram ressuspensas em 40 mL ECFS. Essa etapa de lavagem foi repetida e as células foram novamente ressuspensas em ECFS a uma concentração de 2×10^6 10 células/mL.

A fusão eletro-célula foi realizada com o uso de um gerador de fusão, modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA. O tamanho da câmara de fusão usada foi de 2,0 mL, com o uso dos seguintes ajustes dos instrumentos: 15 condição de alinhamento: voltagem: 50 V, tempo: 50 segundos; quebra de membrana a: voltagem: 3.000 V, tempo: 30 μ segundos; tempo de espera pós-fusão: 3 segundos.

Depois de ECF, as suspensões de células foram cuidadosamente removidas da câmara de fusão sob condições 20 estéreis e transferidas em um tubo estéril contendo o mesmo volume de Meio de Cultura de Hibridoma (DMEM (JRH Biosciences), 15% FBS (Hyclone), suplementado com L-glutamina, pen/estrep, OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (todos de Sigma) e IL-6 (Boehringer 25 Mannheim)). As células foram incubadas por 15-30 minutos a 37°C, e então centrifugadas a 400 x g (1.000 rpm) por cinco minutos. As células foram levemente ressuspensas em um pequeno volume de Meio de Seleção de Hibridoma (Meio de Cultura de Hibridoma suplementado com 0,5 x HA (Sigma, cat. 30 # A9666)), e o volume foi ajustado adequadamente com mais

Meio de Seleção de Hibridoma, baseado em um plaqueamento final de 5×10^6 células B totais por placa de 96 cavidades e 200 μL por cavidade. As células foram levemente misturadas e pipetadas em placas de 96 cavidades e deixadas para crescer. No dia 7 ou 10, metade do meio foi removido, e as células foram realimentadas com Meio de Seleção de Hibridoma.

EXEMPLO 3

SELEÇÃO DE ANTICORPOS CANDIDATOS POR FMAT E FACS

Depois de 14 dias de cultura, sobrenadantes de hibridoma foram rastreados para anticorpos monoclonais específicos para CD20 por Tecnologia de Ensaio Fluorométrico de Microvolume (FMAT) por rastreamento contra células recombinantes CHO-CD20 humanas transfectantes e contra-rastreamento contra células CHO parentais.

Os sobrenadantes da cultura das cavidades de crescimento de células positivas de hibridoma baseadas em rastreamento primário foram removidos e as células positivas de hibridoma CD20 foram suspensas com meio de cultura de hibridoma fresco e foram transferidas para placas de 24 cavidades. Depois de dois dias em cultura, esses sobrenadantes estavam prontos para um rastreamento de confirmação secundário. No rastreamento de confirmação secundário, os positivos no primeiro rastreamento foram rastreados por FACS com dois conjuntos ou três conjuntos de anticorpos de detecção usados separadamente: 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GAH-Gamma Cy5 (JIR#109-176-098) para detecção de cadeia gama humana; 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GAH-Kappa PE (S.B.#2063-09) para detecção de cadeia leve kapa humana, e 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GAH-lambda PE (S.B.#2073-09) para detecção de cadeia leve

lambda humana para confirmar que os anticorpos anti-CD20 eram totalmente humanos.

78 anticorpos monoclonais totalmente humanos específicos para CD20 IgG/kapa ou IgG/lambda foram gerados.

5 Tabela 2

Anticorpos monoclonais específicos para CD20 totalmente humanos

Grupo	Cepa	Antígeno	FMAT	Anticorpo específico para antígeno CD20 (FACS confirmado)	Tempo de imunização
1	G1k	Ramos	77	13	27-38 dias
2	G1KL	Ramos	29	4	
3	G4K	Ramos	26	7	
4	G4KL	Ramos	18	7	
5	G1K	CHO-CD20	94	0	27-38 dias
6	G1L	CHO-CD20	25	3	
7	G4K	CHO-CD20	85	28	
8	G4L	CHO-CD20	50	2	
9	G1K	CHO-CD20	32	0	67 dias
10	G1K	Daudi	165	14	59 dias

EXEMPLO 4

ATIVIDADE APOPTÓTICA

10 Duas abordagens experimentais foram implementadas para rastrear e identificar linhas de anticorpos que exibem atividade pró-apoptótica na linha de células de linfoma humano de Ramos. Mais especificamente, a atividade apoptótica foi avaliada com o uso do ensaio CellTiterGlo e
 15 por coloração Iodeto de Propídio/Hoechst junto com um microscópio automático fluorescente.

De forma breve, para o ensaio CellTiterGlo (Promega, Madison, WI), células Ramos foram obtidas da ATCC e foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% FBS, 1% piruvato de sódio e 1% tampão HEPES. As células foram semeadas em uma concentração de 100.000 células/ml (100 µl/cavidade) em placas de 96 cavidades. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 72 horas. O ensaio foi terminado 72 horas após a adição dos anticorpos e realizado por instruções fornecidas no kit. As células foram tratadas com sobrenadante de hibridoma de anticorpo em uma concentração de 1 ou 10 µg/ml na presença ou ausência de anticorpo de entrecruzamento secundário. Anticorpos de isotipo, (IgG1 e IgG4) bem como Rituxan® (Rituximab - Genentech Inc.) e B1 (Beckman Coulter, Miami, FL), foram usados como controles (Nota: Diálise foi realizada no anticorpo BI para remover sódio azida da solução de tampão de estoque (0,10% sódio azida)). A determinação do percentual de sobrevivência para as amostras de tratamento foi baseada na normalização da amostra de controle (ou seja, sem tratamento) para 100% viável.

Para o estudo de coloração de iodeto de propídio/Hoechst, as células foram semeadas em uma concentração de 100.000 células/ml (50 µl/cavidade) em uma placa de 96 cavidades. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 48 horas. As células foram tratadas com sobrenadante de hibridoma de anticorpo (purificado sobre uma coluna de proteína A Sefarose seguida por diálise em PBS) em uma titulação com concentrações que variam de 5.000 ng/ml a 8 ng/ml. Todos os experimentos foram feitos em duplicata na presença (N=2) ou ausência (N=1) de anticorpo

de entrecruzamento secundário. Anticorpos de isotipo (IgG1 e controles de diluente), bem como Rituximab e B1, foram usados como controles. Depois da incubação por 48 horas, as células foram coradas com PI/Hoechst e visualizadas com o uso de um microscópio automático fluorescente. O percentual de apoptose foi determinado pela proporção do número de células PI positivas (apoptóticas) versus o número de células Hoechst positivas (total).

Para a análise CellTiterGlo, as células foram plaqueadas em duplicata e o erro padrão da média foi determinado com o uso do programa Excel. Para a análise de coloração de iodeto de propídio/Hoechst, os valores médios foram gerados dos pontos em duplicata. Essas médias foram usadas para gerar uma curva de resposta de dose, e essas curvas foram comparadas ao isotipo e controles de diluente para avaliar a atividade apoptótica.

Em resumo, esse estudo interrogou um total de 25 sobrenadantes de hibridoma. A análise revelou que a maioria das linhas de hibridoma de anticorpo anti-CD20 exibiu atividade apoptótica nos ensaios acima mencionados. Um total de 22 linhas foi selecionado para clonagem.

TABELA 3

SUMÁRIO DE SOBRENADANTES DE LINHA DE HIBRIDOMA ANTI-CD20 AVALIADOS EM ENSAIOS DE APOPTOSE

A Tabela lista as linhas negativas de cada ensaio.

As linhas indicadas em negrito foram consistentemente negativas e não levadas adiante.

	Estudo #1/Ensaio de Apoptose da Hoechst em células Ramos	Estudo #2/Ensaio de Apoptose CellTiterGlo em células Ramos

Linhas avali- adas	Com ag. de entrec. (duplic.)	Com ag. de entrec. (duplic.)	Sem ag. de entrec. (duplic.)	Com ag. de entrec. (único)	Com ag. de entrec. (duplic.)	Sem ag. de entrec. (duplic.)
1.1 (G1)						
1.2 (G1)					1.2	1.2
1.3 (G1)						
1.4 (G1)						1.4
1.5 (G1)						
1.6 (G1)						1.6
1.9 (G1)						1.9
1.10 (G1)						
1.11 (G1)						
1.12 (G1)						
1.13 (G1)	1.13					
2.1 (G1)						
2.2 (G1)			2.2			
2.4 (G1)						
3.1 (G4)			3.1			

3.2 (G4)	3.2	3.2	3.2			
3.3 (G4)	3.3	3.3	3.3			
3.4 (G4)			3.4			
3.6 (G4)	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	
3.7 (G4)						
4.1 (G4)	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	
4.2 (G4)			4.2			4.2
4.5 (G4)			4.5			
4.6 (G4)	4.6	4.6	4.6			
4.7 (G4)	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7

TABELA 4

SUMÁRIO DE SOBRENADANTES DE LINHA DE HIBRIDOMA ANTI-CD20
TESTADOS COMO NEGATIVOS EM ENSAIOS DE APOPTOSE

Negativos de ensaio de Apoptose Estudo #1	Negativos de ensaio de Apoptose Estudo #2	Negativo duplo (esses clones não foram levados à clonagem)
3.2	1.2	
3.3		
3.6	3.6	3.6
4.1	4.1	4.1

4.6		
4.7	4.7	4.7

Deve ser observado que o processo acima descrito produz uma mistura oligoclonal em que o número de linhagens de hibridoma presente em cada amostra varia de uma a várias. Há provavelmente uma linhagem de anticorpo específico para CD20 por mistura de hibridomas em cada cavidade. Adicionalmente, as células específicas para antígeno na mistura oligoclonal podem variar amplamente em sua produtividade (a quantidade de anticorpo que elas produzem e secretam). Um forte sinal em um ensaio pode ser o resultado de uma alta concentração de anticorpo, um anticorpo com uma alta afinidade para o alvo, ou uma combinação desses fatores. Portanto, embora resultados quantitativos sejam apresentados a partir desses ensaios, esses resultados são interpretados em uma maneira "positiva" versus "negativa", olhando os vários pontos de dados obtidos e comparando-os aos controles.

A clonagem foi iniciada em todas as linhas recuperadas das fusões 1 e 2 (em que o anticorpo foi IgG1). As linhas das fusões 3 e 4 foram também clonadas com a exceção das linhas 3.6, 4.1 e 4.7.

EXEMPLO 5

ENSAIO DE APOPTOSE: ENSAIO DE VIABILIDADE CELLTITERGLO SEM AGENTE DE ENTRECRUZAMENTO

Para determinar a quantidade de ATP presente na célula, que se correlaciona com o número de células viáveis presente, ensaios CellTiterGlo foram realizados. De forma breve, células de linfoma (Ramos) foram plaqueadas em uma placa de fundo plano Costar de 96 cavidades (Catálogo #

3603) a 10.000 células por cavidade em um volume de 50 µl. Anticorpos primários foram adicionados como 25 µl/cavidade em meio de cultura de tecidos e deixados para incubar com células por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, reagente de CellTiterGlo (Promega Catálogo #G7571) foi adicionado às células e deixado para incubar por 10 minutos em temperatura ambiente no escuro. As placas foram lidas por instruções de protocolo. Os resultados são mostrados nas Figuras 1 (placa 1 de 2 em 72 horas) e 2 (placa 2 de 2 em 72 horas), e resumidos nas tabelas 5 e 6 abaixo. Os valores em **negrito** indicam valores de EC₅₀ que foram superiores ao controle de Rituximab.

EXEMPLE 6

15 ENSAIO DE APOPTOSE: ENSAIO DE VIABILIDADE ALAMAR BLUE SEM
 AGENTE DE ENTRECruzAMENTO

Para medir a apoptose em células Ramos, ensaios de viabilidade Alamar Blue (Biosource, Camarillo, CA) foram realizados. Alamar Blue é um indicador redox que modifica a cor em resposta a atividade metabólica. O ambiente interno de células em proliferação é mais reduzido que aquele de células em não proliferação; Alamar Blue é reduzido em células em proliferação e é acompanhado por uma troca mensurável na cor.

Brevemente, células Ramos foram plaqueadas em placas de fundo plano Costar de 96 cavidades (Catálogo # 3603) a 10.000 células/50 µl. Amostras de anticorpo primário foram adicionadas como 50 µl/cavidade em meio de cultura de tecidos e deixadas para incubar a 37°C por 48 horas. 10 µl por cavidade de corante Alamar Blue foram adicionados e deixados para incubar de um dia para o outro a 37°C. Após a

incubação, a fluorescência foi medida com o uso de Victor (Perkin Elmer, Wellesley, MA).

Os resultados são mostrados nas Figura 3A até 3D (em 72 horas), e resumidos nas tabelas 5 e 6 abaixo. Os valores de negrito indicam valores de EC_{50} que foram superiores ao controle de Rituximab.

EXEMPLO 7

ENSAIO DE APOPTOSE: ENSAIO DE VIABILIDADE WST-1 SEM AGENTE DE ENTRECRUZAMENTO

10 Para medir apoptose em células Ramos, ensaios de viabilidade WST-1 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) foram realizados. Ensaio de redução de WST-1 é um ensaio colorimétrico para quantificação de citotoxicidade, baseado na clivagem do sal de tetrazólio
15 WST-1 por desidrogenases mitocondriais em células viáveis.

Brevemente, células Ramos foram colhidas, contadas e ressuspensas em meio de crescimento completo RPMI em uma concentração de 66.667 células/ml. As células foram plaqueadas em 50 μ l (10.000 células/cavidade) em placas de
20 fundo plano (Costar, cat. no. 3595). Anticorpo foi adicionado a células alvo em concentração adequada como 50 μ l/cavidade e deixado para incubar por 68 horas a 37°C. 10 μ l WST-1 (Roche 1 644 807) por cavidade foram adicionados e incubados por 4 horas a 37°C. As placas foram colocadas em
25 um agitador por 1 minuto e lidas a 450 nm.

Resultados são mostrados nas Figuras 4A até 4D, e resumidos nas tabelas 5 e 6 abaixo. Os valores de negrito indicam valores de EC_{50} que foram superiores ao controle de Rituximab.

EXEMPLO 8

ENSAIO DE APOPTOSE: ENSAIO DE VIABILIDADE DE ANEXIN V/PI
SEM AGENTE DE ENTRECRUZAMENTO

Células de linfoma foram plaqueadas em placas de fundo plano Costar de 96 cavidades (Catálogo # 3603) a 200.000 células por cavidade em um volume de 50 µl. Anticorpos primários foram adicionados como 25 µl/cavidade em meio de cultura de tecidos e deixados para incubar com células por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 1.200 rpm e o sobrenadante foi aspirado. Os péletes de células foram ressuspensos em tampão FACS 100 µl (2% FBS em 1x PBS) e as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 1.00 rpm. Os péletes foram ressuspensos em 100 µl de tampão de incubação (95% 1x tampão de ligação, 2,5% Annexin V, 2,5% PI) e incubados por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após incubação, o volume nos tubos de título foi elevado para 300 µl por adição de 200 µl de 1x tampão (água em óleo Annexin V e PI). Análise foi realizada com o uso de canais FL-1 (Annexin V) e FL-3 (PI) com FACS Calibur.

Resultados são mostrados nas Figuras 5 (placa 1 de 2 em 24 horas) e 6 (placa 2 de 2 em 24 horas), e resumidos nas tabelas 5 e 6 abaixo. Os valores de negrito indicam valores de EC_{50} que foram superiores ao controle de Rituximab.

EXEMPLO 9

ENSAIO DE CDC

Células de linfoma (Ramos, Raji ou Daudi) foram plaqueadas em placas de fundo plano Costar de 96 cavidades (Catálogo # 3603) a 100.000 células por cavidade em um

volume de 25 µl. Amostras de anticorpo primário foram adicionadas como 25 µl/cavidade em meio de cultura de tecidos e deixadas para incubar em temperatura ambiente por 10 minutos. Soro humano normal foi adicionado em uma
5 concentração entre 10 a 50% e diluído com meio de crescimento (concentração de soro foi titulada) (soro obtido de Advanced Research Technologies, San Diego, CA) e deixado para incubar a 37°C por 1 hora. Reagente CellTiter Glo (Promega Catálogo # G7571) foi adicionado às células e
10 deixado para incubar por 10 minutos em temperatura ambiente no escuro. As placas foram lidas por instruções de protocolo.

Os resultados são mostrados nas Figuras 7A-7D (linha de células Ramos em 1 hora), 8A-8D (linha de células Raji
15 em 1 hora) e 9A-9D (linha de células Daudi em 1 hora). Para todos os ensaios, n = 2, exceto Rituximab, e IgG1 n = 3. Os valores médios de EC₅₀ são mostrados na Tabelas 5 e 6 abaixo. Os valores de negrito indicam valores de EC₅₀ que foram superiores ao controle de Rituximab.

20 EXEMPLO 10

ADCC DE ANTICORPOS ANTI-CD20 HUMANOS

Isolação de PBMCs de sangue total (35-45 ml)

Enriquecimento de NK a partir de PMBCs foi realizado com o uso de coquetel de enriquecimento de célula NK humana
25 RosetteSep® e protocolo (Cat. no. 15065). O coquetel de anticorpo RosetteSep® cruza células indesejadas em sangue total humano para múltiplas (RBCs), Imuno-rosetas em formação. Isso aumenta a densidade de células indesejadas (em roseta), de modo que formam péletes junto com os RBCs
30 livres quando centrifugadas em um meio de densidade

flutuante como Ficol-Paque®. As células desejadas nunca estão entre o plasma e o meio de densidade flutuante.

Brevemente, sangue total de doadores foi coletado em tubos heparinizados ou cobertos com EDTA e incubado com 2,25 ml de coquetel de enriquecimento de célula NK humana RosetteSep® (Cat. no. 15065) por 20 minutos em temperatura ambiente por protocolo de RosetteSep®. Amostras foram então diluídas com volume igual de PBS + 2% FBS e 30 mL de mistura de sangue foram colocados em camadas sobre 15 mL Ficoll (Amersham 17-1440-02) em tubos cônicos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 2150 RPM (centrífuga de mesa) com interrupção por 30 minutos em temperatura ambiente. A camada da interface foi transferida para 2 tubos cônicos limpos de 50 ml. PBS + 2% FBS foram adicionados a 50 ml e centrifugados por 10 minutos a 1.200 RPM em uma centrífuga de mesa (Beckman Allegra 6) com brake ligado. Os sobrenadantes foram descartados e os péletes foram ressuspensos em 1 ml PBS e estocados em gelo. As células foram contadas com o uso de um hemacitômetro e células NK/ml em solução foram determinadas $[(\text{células totais}/\# \text{quadrantes}) * 10e4 * \text{fator de diluição}]$.

Rotulagem de células alvo de tumor com Calceína-AM

Calceína-AM é a versão permeável a célula de calceína. Ela passa facilmente através da membrana celular de células viáveis por causa da hidrofobicidade aumentada quando comparada a calceína. Quando Calceína-AM permeia no citoplasma, ela é hidrolisada por esterases em células para calceína que são bem retidas no interior da célula. Portanto, Calceína-AM é um marcador adequado para coloração de células viáveis. Ensaio de viabilidade que usam

calceína são confiáveis e correlacionam-se bem com o ensaio padrão de liberação de ^{51}Cr .

Brevemente, células alvo tumorais (Ramos, Raji e Daudi) foram coletadas e ressuspensas em meio a 1×10^6 células/ml. Calceína-AM (Sigma C1359) foi adicionada a uma concentração final de $10 \mu\text{M}$ ($5 \mu\text{l}$ em 2 mL de células). Células foram incubadas por 45 minutos a 37°C . As células foram então giradas a 1.200 RPM por 10 minutos, sobrenadantes foram descartados, e os péletes foram ressuspensos em meio de crescimento fresco (2x). Os péletes foram ressuspensos a $10.000 \text{ células}/75 \mu\text{l}$. Células alvo foram plaqueadas em $75 \mu\text{l}$ ($10.000 \text{ células}/\text{cavidade}$) em placas de fundo redondo (Costar, cat. no. 3799). Anticorpos foram então adicionados a células alvo em concentrações adequadas como $50 \mu\text{l}/\text{cavidade}$, diluídos em meio e deixados para incubar por 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, $75 \mu\text{l}$ de células efetoras foram adicionados a $100.000 \text{ células}/\text{cavidade}$ e deixados para incubar por 4 horas a 37°C . Após incubação, placas foram giradas a 1.200 RPM por 5 minutos. $100 \mu\text{l}$ de sobrenadantes foram transferidos para placas de fundo claro, plano, pretas (Costar, cat. no. 3603), e a fluorescência foi medida.

Resultados são mostrados nas Figuras 10-12, e resumidos nas tabelas 5 e 6 abaixo. Os valores de **negrito** indicam valores de EC_{50} que foram superiores ao controle de Rituximab.

Candidatos líderes foram selecionados com base no número de casos em que o anticorpo de teste exibiu potência superior quando comparado a controles em apoptose, CDC e ADCC. Anti-CD20 mAbs 2.1.2, 1.1.2 e 1.5.3 (nota: mAbs 1.5.3

e 1.3.3 têm seqüências de aminoácidos idênticas) foram identificadas como as três melhores candidatas.

TABELA 5
SUMARIO DO ENSAIO

[illegible]

TABELA 6
ORDEM DE CLASSIFICAÇÃO

[illegible]

ENSAIO DE SANGUE TOTAL

Rotulagem de células alvo com calceína-AM

Células alvo tumorais (Ramos, Raji Daudi) foram coletadas e ressuspensas em meio a 1×10^6 células/ml.

5 Calceína-AM (Sigma, cat. no. C1359) foi adicionada a uma concentração final de 10 μ M (5 μ l em 2 mL de células) e deixada para incubar por 45 minutos a 37°C. Após incubação, as células foram giradas a 1.200 RPM por 10 minutos, sobrenadantes foram descartados, e péletes foram

10 ressuspensos em meio de crescimento fresco (2x). Péletes foram ressuspensos a 10.000 células/75 μ l. As células alvo foram então plaqueadas em 75 μ l (10.000 células/cavidade) em placas de fundo redondo (Costar, cat. no. 3799). Anticorpos foram adicionados a células alvo em concentração

15 adequada como 50 μ l/cavidade diluídos em meio e deixados para incubar por 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, 50 μ l de sangue total foram adicionados por cavidade e deixados para incubar por 4 horas a 37°C (Nota: Sangue total foi coletado em tubos que contêm heparina.)

20 Após incubação, as placas foram giradas a 1.200 RPM por 5 minutos. 100 μ l de sobrenadantes foram transferidos para placas de fundo claro, planas, pretas (Costar, cat. no. 3603), e a fluorescência foi medida.

Os resultados de citotoxicidade em ensaio de sangue

25 total em concentração de início de anticorpo de 10 μ g/ml mostrados na Figura 13 demonstram que os anticorpos 1.1.2 e 2.1.2 medeiam maior lise celular quando comparados ao anticorpo de controle Rituximab, especialmente como demonstrado na linha de células Raji.

30 A atividade citotóxica de um painel de mAbs anti-CD20

foi avaliada contra linhas de células EHEB e Karpas-422, com o uso de sangue não fracionado como uma fonte de efetores naturais. EHEB é uma linha de leucemia crônica de células B humanas (CLL), enquanto Karpas-422 é uma linha de células de Linfoma não Hodgkin. A linha Karpas-422 foi previamente relatada como sendo resistente a Rituximab e complemento (*Br J Haematol.* 2001;114:800-9). Essas linhas de células foram avaliadas no ensaio de sangue total para comparar sua sensibilidade relativa aos anticorpos acima e Rituximab. Os dados mostrados na Figura 14 indicam que tanto as linhas de células EHEB quanto Karpas-422 são resistentes ao tratamento com Rituximab; no entanto, os anticorpos anti-CD20 2.1.2, 1.1.2 e 1.5.3 medeiam significativamente maiores níveis de lise de células em linhas de células Karpas-422, e anticorpos anti-CD20 1.1.2, 1.5.3, 1.10.3.1 e 1.11.3.1 medeiam significativamente maiores níveis de lise de células em linhas de células EHEB.

Comparação de atividade lítica

Esses achados foram também estendidos a um número de linhas de células derivadas de linfomas não Hodgkin (Daudi, Ramos, ARH-77, Namalwa, Raji, SC1, WSU-NHL, SU-DHL-4 e Karpas 422) e leucemia linfocítica crônica (EHEB, JMV-2 e HvIV-3). A atividade citolítica de um painel de anticorpos anti-CD20 foi avaliada com o uso de sangue não fracionado de diferentes doadores humanos, uma vez que a variação na atividade de anticorpos anti-CD20 varia como uma função de um polimorfismo no receptor FcγRIIIa (*Blood* 2002; 99:754-758). Os dados mostrados nas Figuras 15 e 16 indicam que, nos doadores e linhas de células, os anticorpos anti-CD20

1.1.2 e 1.5.3 medeiam um maior nível de lise de células em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml.

Para também avaliar a atividade citotóxica de anticorpos anti-CD20, as linhas de células resistentes a citotoxicidade mediada por complemento mediado por rituximab foram geradas e a atividade de anticorpos monoclonais 1.5.3 e 1.1.2 no ensaio de sangue total foi testada. Linhas de células Ramos e Raji resistentes a Rituximab foram geradas por 3 ciclos de exposição repetitiva a Rituximab na presença de concentração crescente de soro humano (Research Blood Components, LLC). Células Raji e Ramos (linfoma de Burkitt) foram obtidas de ATCC e foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% FBS, 1% piruvato de sódio e 1% tampão HEPES. Para o primeiro ciclo de seleção, as células foram expostas a 1 µg/ml de Rituximab na presença de 20% soro humano por 16 h a 37°C e em 5% CO₂. Para o segundo e o terceiro ciclos, a concentração de Rituximab foi aumentada para 10 e 100 µg/ml, respectivamente, na presença de até 50% de soro humano. Depois de cada ciclo, a viabilidade das células foi avaliada como o kit Guava ViaCount (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA). As células resistentes a Rituximab (RR-Raji ou RR-Ramos) foram clonadas por diluição limitada e clones foram expandidos.

A resistência a atividade mediada por CDC por Rituximab foi confirmada para cada clone. Nos 3 clones gerados para as linhas de células Raji e para as linhas de células Ramos, a expressão de CD20 foi preservada e mostrou ser equivalente às linhas de células parentais por análise FACS. A Figura 17 ilustra que células RR1-Raji não foram

mortas na presença de 1 ou 10 µg/ml de Rituximab, enquanto a linha de células Raji parentais permaneceu sensível. Em contraste 10 µg/ml de 1.5.3 ou 1.1.2 foram capazes de lisar cerca de 50% das células RR.1-Raji nesse ensaio de 4 horas.

5 A atividade lítica aumentada foi também observada nas linhas de células RR1-Ramos, RR6-Ramos e RR8-Ramos com anticorpos monoclonais 1.5.3 e 1.1.2 comparados a Rituximab como ilustrado na Figura 18.

EXEMPLO 12

10 DETERMINAÇÃO DE KD DE FACS PARA SETE ANTICORPOS MONOCLONAIS PURIFICADOS QUE SE LIGAM A CÉLULAS SB QUE EXPRESSAM CD20

A afinidade de anticorpos purificados contra CD20 (mAbs 1.1.2, 1.2.1, 2.1.2, 1.3.3, 1.5.3, 1.10.3.1, 1.13.2), Rituximab (controle positivo) e B1 foi determinada por
15 FACS. Brevemente, células SB que expressam CD20 foram ressuspensas em tampão FACS (2% FBS, 0,05% NaN₃) em uma concentração de aproximadamente 5 milhões de células/mL. Células HSB foram também ressuspensas em tampão FACS em uma concentração de aproximadamente 9 milhões de células/mL. As
20 células foram mantidas em gelo. Anticorpos purificados foram diluídos em série em 1x PBS filtrado (2x) por 11 cavidades em placas de 96 cavidades. A décima segunda cavidade em cada fileira continha tampão, apenas. 1x PBS e células foram adicionados a cada cavidade de mAb de modo
25 que o volume final foi 30 µL/cavidade e cada cavidade continha aproximadamente 375.000 células. As faixas de concentração molecular final para as mAbs foram como se segue:

	mAb	Concentração
30	1.1.2	= 156 – 0,304 nM

	1.2.1	=	202	-	0,098	nM
	2.1.2	=	396	-	0,387	nM
	1.3.3	=	289	-	0,283	nM
	1.5.3	=	107	-	0,104	nM
5	1.10.3.1	=	265	-	0,258	nM
	1.13.2	=	367	-	0,358	nM
	Rituximab	=	365	-	0,356	nM
	B1	=	351	-	0,343	nM

Placas foram colocadas em um agitador de placa por 3
 10 horas a 4°C, então giradas e lavadas 3x com PBS. 200 µL de anticorpo policlonal α-humano de cabra 145 nM Cy5 foram adicionados a cada cavidade, e 200 µL de anticorpo policlonal α- camundongo de cabra 192 nM Cy5 foram adicionados às células em complexo com anticorpo B1. As
 15 placas foram então incubadas por 40 minutos a 4°C, então giradas e lavadas 3x com PBS.

A Fluorescência Média Geométrica (GMF) de 10.000 células para cada concentração de mAb foi determinada com o uso de um instrumento FACSCalibur. Nenhuma ligação
 20 significativa não específica (nenhum sinal significativo) foi aparente a partir das células HSB. Em cada fileira contendo as células SB, o sinal da décima- segunda cavidade (contendo tampão, apenas) foi subtraído do sinal das primeiras 11 cavidades. Um gráfico não linear de GMF como
 25 uma função de concentração molecular de mAb foi ajustado com o uso de programa Scientist usando a equação:

$$F = P' \cdot \frac{(K_D + L_T + 1) - \sqrt{((K_D + L_T + 1))^2 - 4(L_T)}}{2}$$

Na equação acima, F = Fluorescência Média Geométrica,
 30 L_T = concentração total de mAb molecular, P' = constante de

proporcionalidade que relaciona unidades de fluorescência arbitrária a mAb ligada, e K_D = constante de dissociação de equilíbrio. Para cada mAb, uma estimativa para K_D foi obtida, uma vez que P' e K_D variaram livremente na análise não linear. A tabela abaixo lista as K_{Ds} resultantes para cada mAb junto com o intervalo de confiança de 95% do ajuste. As MAb's são listadas em ordem de afinidade decrescente. Baseado em várias medições prévias independentes de Rituximab com o uso desse método de análise FACS K_D , a precisão esperada é de 12% baseado em desvio padrão (coeficiente de variação) e 30% de precisão baseado nos intervalos de confiança de 95%. No entanto, a precisão pode variar com cada mAb.

TABELA 7

Amostra	K_D (nM)	95% CI (nM)
2.1.2	3,8	0,5
Rituximab	8,1	1,2
1.3.3	8,9	1,1
1.5.3	9,1	1,1
1.1.2	11,1	0,5
1.10.3.1	11,2	0,8
1.2.1	11,9	1,0
1.13.2	23,6	4,4
B1	34,1	2,9

EXEMPLO 13

ANÁLISE ESTRUTURAL DE ANTICORPOS ANTI-CD20

As cadeias pesadas variáveis e as cadeias leves variáveis dos anticorpos foram seqüenciadas para determinar suas seqüências de DNA. A informação de seqüência completa para os anticorpos anti-CD20 é fornecida em uma listagem de seqüência com seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos para cada combinação de cadeia gama e kapa. As seqüências pesadas variáveis foram analisadas para determinar a

família VH, a sequência de região D e a sequência de região J. As sequências foram então traduzidas para determinar a sequência de aminoácidos primária e foram comparadas às sequências de região VH, D e J de linha germinativa para
5 avaliar hipermutações somáticas. "-" indica identidade com a sequência de linha germinativa. "#" indica um aminoácido adicional nas sequências de anticorpo que não é encontrado na linha germinativa.

A Tabela 8 é uma tabela que compara as regiões de
10 cadeia pesada do anticorpo à sua região de cadeia pesada de linha germinativa cognata. A Tabela 9 é uma tabela que compara as regiões de cadeia leve kapa de anticorpo à sua região de cadeia leve de linha germinativa cognata.

As regiões variáveis (V) de cadeias de imunoglobulina
15 são codificadas por múltiplos segmentos de DNA de linha germinativa, que são unidos em regiões variáveis funcionais (VH DJH ou VK JK) durante a ontogenia de células B. A diversidade molecular e genética da resposta do anticorpo a CD20 foi estudada em detalhe. Esses ensaios revelam vários
20 pontos específicos para anticorpos anti-CD20.

A análise de 36 anticorpos individuais específicos para CD20, que foram isolados de 8 fusões de hibridoma, resultou na determinação de que a maioria dos hibridomas usa os mesmos pares de cadeia pesada e leve para formar um
25 paratopo específico para CD20. O paratopo selecionado consiste na cadeia leve Vk A23 pareada com cadeias pesadas VH5-51. Apenas duas mAbs foram isoladas, sendo que a cadeia leve Vk A23 foi pareada com uma cadeia pesada VH1-18. Uma única mAb usou cadeia leve Vλ V4-3 pareada com uma cadeia
30 pesada VH6-1, e uma única mAb que usou Vλ V2-13 pareada com

VH1-18.

A predominância de VH5 foi confirmada com 31 de 36 mAbs derivadas de hibridoma únicas. As cadeias pesadas derivadas de VH5-51 foram extensivamente mutadas através de CDR 1 e FR3. As seqüências de mAbs VH5-51 representam eventos de multi-rearranjos, como indicado por diferentes padrões de substitutos e variações em uso de CDR3 e JH. Substituições idênticas foram observadas em cadeias pesadas VH5-51 de diferentes rearranjos (Ser³¹ para Asn³¹ em CDR1, e Met⁹³ para Ile⁹³ em FR3, por exemplo), significando seleção dirigida por antígeno.

28 mAbs analisadas utilizaram cadeias leves derivadas de Vk A23 na formação de domínios de ligação específicos para CD20. Todas as cadeias Vk A23 foram rearranjadas com uma CDR3 de 9 aminoácidos e foram mutadas quando comparadas à linha germinativa nas CDRs. Em 21 mAbs, as cadeias isoladas A23 kapa pareciam derivar de um único evento de rearranjo, como indicado pelo padrão de mutação, e partilharam uso do segmento JK4. Substituições idênticas foram encontradas em diferentes mAbs (Ser³² para Arg³² em CDR1, Ile⁵⁶ para Val⁵⁶ em CDR2, e Met⁸⁹ para Val⁸⁹ em CDR3), sugerindo seleção dirigida por antígeno para esses resíduos particulares nessas localizações durante maturação de afinidade.

As três mAbs líderes, como determinado por atividade pró-apoptótica, bem como a capacidade de despertar CDC e ADCC (acima descrita), mAbs 1.1.2, 1.5.3 e 2.1.2, utilizam a cadeia leve Vkapa A23 pareada com a cadeia pesada VH5-51. Ambas as cadeias, pesada e leve, foram mutadas, primariamente nas CDRs. Os anticorpos líderes representam

TABELA 8

Id. de Seq. N°	Nome da Cadeia	V	D	J	ER1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
139		Linha germin.			QVOLVQSGAE VKPGASVKV SCKAS	GYTETSIGI S	WVROAP GQGLEW MG	WISAYNGNTNYAQK LQG	RVTMTTDTSTST AYMELSLRSDD TAVYYCAR	##TAM#DY	WQOGT LVTVS S
66	50-001H 3_3_IN1G4	VH1- 18	D5- 5	JH4 B	----- ----- -----	----- ----- -----	----- ----- -----	--N----- -R----- -----	-----F----- -D----- -----	AS---G--	----- ----- -----
140		Linha germin.			QVOLVQSGAE VKPGASVKV SCKAS	GYTETSIGI S	WVROAP GQGLEW MG	WISAYNGNTNYAQK LQG	RVTMTTDTSTST AYMELSLRSDD TAVYYCAR	#SSW#FDY	WQOGT LVTVS S
62	50-001H 3_2_IN1G4	VH1- 18	D6- 13	JH4 B	----- ----- --T--	--S-S----- ----- -----	----- ----- -----	-----H-R----- ----- -----	-----S----- ----- -----	A---Y--C	----- ----- -----
141		Linha germin.			QVOLVESGGG LVKPGGSLRL SCAAS	GFTFSDIYM S	WVROAP GKGLEW VS	YISSSGSTIYYADS VKG	RFTISRDNAKNS LYLQMNLSRAED TAVYYCAR	###YGGN# HYFDY	WQOGT LVTVS S
86	50-001H 6_3_IN1G1	VH3- 11	D4- 23	JH4 B	----- ----- -----	----- ----- -----	----- ----- -----	-----T----- ----- -----	----- ----- -----	DLY----- SY----- -----	----- ----- -----
142		Linha germin.			QVOLVESGGG VVQPGSLRL SCAAS	GFTFSSYGM H	WVROAP GKGLEW VA	VIVYDGSNRYIYADS VKG	RFTISRDNKNT LYLQMNLSRAED TAVYYCA#	###FDY	WQOGT LVTVS S
82	50-001H 4_6_IN1G4	VH3- 33	N.A	JH4 B	-----A-- ----- -----	----- ----- -----	----- ----- -----	---H---K---E-- ----- -----	----- ----- -----R-----	NWF-----	----- ----- -----
143		Linha germin.			EVOLVQSGAE VKPGGESIKI SCKGS	GYSETSAMI G	WVRQMP GKGLEW MG	IIVPGDSDFRYSPS PQG	QVLTISADKSIST AYLOWSSLSKASD TAVYYCAR	###YVYYY GMDV	WQOGT TVTVS S
10	50-001H 1_11_3_IN1G1	VH5- 51	N.A	JH6 B	----- ----- -----	-----N----- V----- -----	----- ----- -----	----- ----- -----	----- ----- -----	HGD-----	----- ----- -----
18	50-001H 1_13_IN1G1	"	"	"	----- ----- -----	-----N----- ----- -----	----- ----- -----	----- ----- -----	----- ----- -----	QGD--H-- S-----	----- ----- -----

78	50-001H 4_2_1_1N1G4	VH5- 51	D3- 22	JH4 B	EVOLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGS	GYSTSYWI G	WVRQMP GKGLEW MG	IIVPGSDTRYSPS FOG	QVTISADKSIST AYLOWSSSLKASD TAMYYICAR	QGD- GP-	WGQGT LVTVS S
150		Linha germin.									
42	50-001H 1_9_1N1G1	VH5- 51	D3- 3	JH4 B							
151		Linha germin.									
6	50-001H 1_10_3_1N1G1	VH5- 51	D3- 3	JH6 B							
46	50-001H 2_1_1N1G1	"	"	"							
50	50-001H 2_2_1N1G1	"	"	"							
152		Linha germin.									
34	50-001H 1_6_1N1G1	VH5- 51	D4- 11	JH3 B							
153		Linha germin.									
70	50-001H 3_4_1N1G4	VH5- 51	D6- 19	JH3 A							
154		Linha germin.									
134	50-001H 8_2_1N1G4	VH6- 1	D1- 20	JH4 B							

TABELA 9
SEQUÊNCIAS DE CADEIA LEVE DE ANTICORPO ANTI-CD20

Id. de Seq. N°	Nome da Cadeia	V	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
155		Linha germin		DVMTQSP LSLPVTIG QPASISC	RSSQSLVSDGNTYLN	WFQRPQSP RRLIY	KVSNWDS	GVPDFSGSGS GTDFTLKISRV EAEDVGYYC	MOGTH#	FGGTR VEIK
36	50-001H 1_6_1N1K	A1	JK 3	----- ----- -----	-----A-----	----- ----- -----	-----	-----R----- -----A-----	---I-C---	----- -H--
156		Linha germin		DVMTQSP LSLPVTIG QPASISC	RSSQSLVSDGNTYLN	WFQRPQSP RRLIY	KVSNWDS	GVPDFSGSGS GTDFTLKISRV EAEDVGYYC	MOGTHWPLT	FGGTR VEIK
20	50-001H 1_13_1N1K	A1	JK 4	----- -----S-----	-----N-D-----	----- -L-----	-----	-----V-----	-----	-----
124	50-001H 7_7_1N1K	"	"	----- ----- -----	-----R-----S-----	----- ----- -----	-----	-----A----- -----D-----H-----	-----LA-----	-----
157		Linha germin		DVMTQSP LSLPVTIG QPASISC	RSSQSLVSDGNTYLN	WFQRPQSP RRLIY	KVSNWDS	GVPDFSGSGS GTDFTLKISRV EAEDVGYYC	MOGTHW#IT	FGGTR LEIK
44	50-001H 1_9_1N1K	A1	JK 5	----- ----- -----	-----	----- ----- -----	-----	-----	-----S-----	-----
158		Linha germin		DVMTQSP LSLPVTIG QPASISC	RSSQSLVSDGNTYLS	WFQRPQSP RRLIY	KISNRES	GVPDFSGSGA GTDFTLKISRV EAEDVGYYC	MOATQ#T	FGGTR VEIK
12	50-001H 1_11_3_1N1K	A23	JK 4	----- ----- -----	-----R-----H-----	----- -----S-----	-V-----	-----	-----PL-----	-----
4	50-001H 1_1_2N1K	"	"	----- ----- -----	-----Y-----	----- -----	-----	-----	V-----PL-----	-----
16	50-001H 1_12_1N1K	"	"	----- ----- -----	-----Y-----	-----F-----	-----	-----	V-----PL-----	-----

32	50-001H 1 5 3N1K	"	"	"	Y					V---	PL-	
40	50-001H 1 7 1N5K	"	"	"		E					PL-	--R
56	50-001H 2 4 1N1K	"	"	"		E					PL-	
60	50-001H 3 1 1N1K	"	"	"	S	R		V-H			PL-	
64	50-001H 3 2 1N1K	"	"	"							PL-	
68	50-001H 3 3 1N1K	"	"	"	E	K					PL-	
72	50-001H 3 4 1N1K	"	"	"		Y		H			PL-	-K-
76	50-001H 3 7 1N1K	"	"	"					L		PL-	
80	50-001H 4 2 1 1N1K	"	"	"		YR					PL-	
84	50-001H 4 6 1N1K	"	"	"	K			F	N		PL-	
96	50-001H 7 17 1N1K	"	"	"	P	R			K		PL-	
100	50-001H 7 18 1N1K	"	"	"						L-V	PL-	-K-
92	50-001H 7 1 1N1K	"	"	"					L		PL-	

5

10

15

20

25

30

108	50-001H 7_23_1_1N1K	"	"	-----F--	-----	-----	-----	-----PL-	-----
112	50-001H 7_24_1_1N1K	"	"	-----H--	-----	-----	-----	-----PL-	-----
116	50-001H 7_26_1N1K	"	"	-----S--	-----	-----	-----	-----PL-	-----
120	50-001H 7_28_1_1N1K	"	"	-----F--	-----S--	-----	-----	I-----PL-	-----
128	50-001H 7_8_1N1K	"	"	-----F--	-----	-----	-----	-----PL-	-----
132	50-001H 7_9_1N1K	"	"	-----H--	-----	-----	-----	-----PL-	-----D--
159		Linba Germin.		DIVMTOTP LSSPVTDG QPASISC	RSSQSLVHSDGNTYLS	WLQQRPGQPP RLLIY	KISNRFS	MOATQPPIT	FGQGR LEIK
24	50-001H 1_2_1_1N1K	A23	JK 5	-----K--	-----	-----	-S--	V-----	-----
48	50-001H 2_1_1N1K	"	"	-----SR--	-----	-----	-----	-----L-	-----
52	50-001H 2_2_1N1K	"	"	-----SR--	-----	-----	-----	-----	-----
104	50-001H 7_21_1N1K	"	"	-----R--	-----	-----	-V--	V-E-L---	I-----
28	50-001H 1_4_1N1K	"	"	-----	-----	-----	-----	I-----	-----
160		Linba Germin.		EIVMTOSP ATISVSPG ERATISC	RASQSVSSNLA	WYQKPGQAP RLLIY	GASTRAT	QQYNNW#T	FGGGRK VEIK

8	50-001H 1_10_3_IN1K	L2	JX 4							H---D-SL-		
161		Linha Germin.		SSELTQDP AVSVAIGO TVRLTC	OQDSIRSYVAS	WYQQPGQAP VLVIY	GKNRPS	GIPDRFGSSS GNTASLTITGA QAEDADYYC	NDRDSSGNH#V		FGGTK LTVL	
88	50-001H 6_3_IN1L	V2- 13	JL 2						A---D-	V-		
162		Linha Germin.		QPVLQTPT SLSASPGA SARLTC	TLRSGINLGYSRIE	WYQQKPSPF RYELS	XYSDSK	HQSGVPSRFS GSKDASSNAGI LVISGLOSE	EADYYCMIWHSSA# V		FGGTK LTVL	
136	50-001H 8_2_IN1L	V4-3	JL 2				R-		--IF-- W-			

EXEMPLO 14

DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS DE CLASSE CANÔNICA

Chothia e cols. descreveram a estrutura de anticorpo em termos de "classes canônicas" para as regiões hipervariáveis de cada cadeia de imunoglobulina (*J. Mol Biol.* 20 de agosto de 1987; 196(4):901-17). As estruturas atômicas dos fragmentos Fab e VL de uma variedade de imunoglobulinas foram analisadas para determinar a relação entre suas seqüências de aminoácidos e as estruturas tridimensionais de seus sítios de ligação de antígeno. Chothia e cols. descobriram que havia relativamente poucos resíduos que, através de seu empacotamento, ligação de hidrogênio ou a capacidade de assumir conformações não usuais phi, psi ou omega, foram primariamente responsáveis pelas conformações de cadeia principal das regiões hipervariáveis. Esses resíduos ocorrem em sítios nas regiões hipervariáveis e na estrutura de folha β -conservada. Por exame das seqüências de imunoglobulinas que têm estrutura desconhecida, Chothia e cols. mostraram que várias imunoglobulinas têm regiões hipervariáveis que são similares em tamanho a uma das estruturas conhecidas e adicionalmente continham resíduos idênticos nos sítios responsáveis pela conformação observada.

Sua descoberta indica que essas regiões hipervariáveis têm conformações próximas àquelas nas estruturas conhecidas. Para cinco das regiões hipervariáveis, o repertório de conformações parece ser limitado a um número relativamente pequeno de classes estruturais distintas. Essas conformações de cadeia principal que ocorrem comumente das regiões hipervariáveis foram denominadas

"estruturas canônicas". Trabalho adicional por Chothia e cols. (*Nature* 21-28 de dezembro de 1989; 342(6252):877-83) e outros (Martin, e cols. *J Mol Biol.* 15 de novembro de 1996; 263(5):800-15) confirmou que há um pequeno repertório
 5 de conformações de cadeia principal para pelo menos cinco das seis regiões hipervariáveis de anticorpos.

As CDRs de cada anticorpo acima descritas foram analisadas para determinar sua classe canônica. Como é conhecido, classes canônicas foram determinadas apenas para
 10 CDR1 e CDR2 da cadeia pesada do anticorpo, junto com CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve do anticorpo. As tabelas abaixo resumem os resultados da análise. Os dados de Classe Canônica estão na forma de HCDR1-HCDR2-LCDR1-LCDR2-LCDR3 (H1-H2-L1-L2-L3), enquanto "HCDR" refere-se a CDR de cadeia
 15 pesada e "LCDR" refere-se a CDR de cadeia leve. Portanto, por exemplo, uma classe canônica de 1-3-2-1-5 refere-se a um anticorpo que tem uma HCDR1 que está na classe canônica 1, uma HCDR2 que está na classe canônica 3, uma LCDR1 que está na classe canônica 2, uma LCDR2 que está na classe
 20 canônica 1, e uma LCDR3 que está na classe canônica 5.

Foram feitas designações a uma classe canônica particular em que a seqüência de anticorpo combinava com os aminoácidos definidos para cada classe canônica. Os aminoácidos definidos para cada anticorpo podem ser
 25 encontrados, por exemplo, nos artigos por Chothia e cols. acima referidos. A Tabela 10 e Tabela 11 relatam os dados de classe canônica para cada um dos anticorpos CD20. Quando não há qualquer combinação de classe canônica com o mesmo comprimento de CDR, a designação de classe canônica é
 30 marcada com uma letra s e um número, como "s18",

significando que a CDR é de tamanho 18. Quando a estrutura da CDR é prevista como sendo similar a uma classe canônica definida, mas com um desvio provável, a designação de classe canônica é marcada com um "^". Quando não havia
5 qualquer dado de sequência disponível para uma das cadeias pesada ou leve, a classe canônica é marcada com "Z".

TABELA 10

Anticorpo (ordenado)	H1-H2-L1-L2-L3	Comprimento H3
50-001H1_10_3_1	1-2-2-1-s9	15
50-001H1_11_3_1	1-2-4-1-1	12
50-001H1_12_3_1	1-2-4-1-1	13
50-001H1_13_3_1	1-2-4-1-1	12
50-001H1_1_1	1-2-8-1-1	13
50-001H1_2_1_1	1-2-4-1-1	12
50-001H1_3_1	1-2-4-1-1	13
50-001H1_4_1	1-2-8-1-1	13
50-001H1_5_1	1-2-4-1-1	13
50-001H1_6_1	1-2-4-1-4	12
50-001H1_7_1	1-2-4-1-1	12
50-001H1_9_1	1-2-4-1-s10	13
50-001H2_1_1	1-2-4-1-1	13
50-001H2_2_1	1-2-4-1-1	13
50-001H2_4_1	1-2-4-1-1	14
50-001H3_1_1	1-2-4-1-1	12
50-001H3_2_1	1-2-4-1-1	8
50-001H3_3_1	1-2-4-1-1	8
50-001H3_4_1	1-2-4-1-1	14
50-001H3_7_1	1-2-4-1-1	12

50-001H4_2_1_1	1-2-4-1-1	12
50-001H4_5_1	1-2-Z-Z-Z	12
50-001H4_6_1	1-3-4-1-1	6
50-001H6_3_1	1-3-9-1-5	13
50-001H7_17_1	1-2-4-1-1	12
50-001H7_18_1	1-2-4-1-1	12
50-001H7_1_1	1-2-4-1-1	12
50-001H7_21_1	1-2-4 [^] -1-1	12
50-001H7_23_1_1	1-2-4-1-1	12
50-001H7_24_1_1	1-2-4-1-1	15
50-001H7_26_1	1-2-4-1-1	15
50-001H7_28_1_1	1-2-4-1-1	12
50-001H7_7_1	1-2-4-1-s10	12
50-001H7_8_1	1-2-4-1-1	12
50-001H7_9_1	1-2-4-1-1	12

TABELA 11

Anticorpo H1-H2-L1-L2-L3 Comprimento H3
(ordenado)

50-001H1_10_3_1	1-2-2-1-s9	15
50-001H7_21_1	1-2-4 [^] -1-1	12
50-001H3_2_1	1-2-4-1-1	8
50-001H3_3_1	1-2-4-1-1	8
50-001H1_11_3_1	1-2-4-1-1	12
50-001H1_13_1	1-2-4-1-1	12
50-001H1_2_1_1	1-2-4-1-1	12
50-001H1_7_1	1-2-4-1-1	12
50-001H3_1_1	1-2-4-1-1	12
50-001H3_7_1	1-2-4-1-1	12
50-001H4_2_1_1	1-2-4-1-1	12
50-001H7_17_1	1-2-4-1-1	12

	50-001H7_18_1	1-2-4-1-1	12
	50-001H7_1_1	1-2-4-1-1	12
	50-001H7_23_1_1	1-2-4-1-1	12
	50-001H7_28_1_1	1-2-4-1-1	12
	50-001H7_8_1	1-2-4-1-1	12
5	50-001H7_9_1	1-2-4-1-1	12
	50-001H1_12_1	1-2-4-1-1	13
	50-001H1_3_1	1-2-4-1-1	13
	50-001H1_5_1	1-2-4-1-1	13
	50-001H2_1_1	1-2-4-1-1	13
10	50-001H2_2_1	1-2-4-1-1	13
	50-001H2_4_1	1-2-4-1-1	14
	50-001H3_4_1	1-2-4-1-1	14
	50-001H7_24_1_1	1-2-4-1-1	15
	50-001H7_26_1	1-2-4-1-1	15
	50-001H1_6_1	1-2-4-1-4	12
15	50-001H7_7_1	1-2-4-1-s10	12
	50-001H1_9_1	1-2-4-1-s10	13
	50-001H1_1_1	1-2-8-1-1	13
	50-001H1_4_1	1-2-8-1-1	13
	50-001H4_5_1	1-2-Z-Z-Z	12
20	50-001H4_6_1	1-3-4-1-1	6
	50-001H6_3_1	1-3-9-1-5	13

A Tabela 12 é uma análise do número de anticorpos por classe. O número de anticorpos que têm a classe canônica particular designada na coluna da esquerda é mostrado na coluna da direita. A mAb desprovida de um dado de sequência de cadeia e assim tendo "Z" na designação canônica não é incluída nessa contagem. A estrutura mais comumente observada foi 1-2-4-1-1, com 25 de 34 mAbs tendo ambas as seqüências de cadeia pesada e leve dessa combinação.

TABELA 12

NÚMERO DE ANTICORPOS CD20 EM CADA COMBINAÇÃO DE CLASSE
canônica

H1-H2-L1-L2-L3	cont.
1-2-2-1-s9	1
1-2-4 ⁻ -1-1	1
1-2-4-1-1	25
1-2-4-1-4	1
1-2-4-1-s10	2
1-2-8-1-1	2
1-3-4-1-1	1
1-3-9-1-5	1

EXEMPLO 15

CARACTERIZAÇÃO DE EPITOPO: SÍNTESE-SPOT DE PEPTÍDEOS
SINTÉTICOS

15 Detecção de interação de baixa afinidade peptídeo-anticorpo

Uma scan de peptídeo de sobreposição que transpõe os 43 domínios extracelulares do aminoácido da seqüência de CD20 humana foi preparado por síntese SPOT automatizada. Uma série de 33 12-mer peptídeos foi sintetizada como pontos em folhas de membrana de polipropileno. O arranjo de peptídeos transpôs os resíduos de aminoácidos 142-185 da seqüência de CD20. Cada peptídeo consecutivo foi deslocado por um resíduo do peptídeo anterior, gerando uma biblioteca agrupada, de sobreposição de oligopeptídeos arranjados, como mostrado na Tabela 13.

TABELA 13

Peptídeo	Id. de Seq. N°:
1 KISHFLKMESLN	163
2 ISHFLKMESLNF	164
3 SHFLKMESLNFI	165

4 HFLKMESLNFIR	166
5 FLKMESLNFIRA	167
6 LKMESLNFIRAH	168
7 KMESLNFIRAHT	169
8 MESLNFIRAHTP	170
9 ESLNFIRAHTPY	171
10 SLNFIRAHTPYI	172
11 LNFIRAHTPYIN	173
12 NFIRAHTPYINI	174
13 FIRAHTPYINIY	175
14 IRAHTPY1N1YN	176
15 RAHTPYINIYNC	177
16 AHTPYINIYNCE	178
17 HTPYINIYNCEP	179
18 TPYINTYNCEPA	181
19 PYINIYNCEPAN	182
20 YINIYNCEPANP	183
21 INIYNCEPANPS	184
22 NIYNCEPANPSE	185
23 IYNCEPANPSEK	186
24 YNCEPANPSEKN	187
25 NCEPANPSEKNS	188
26 CEPANPSEKNSP	189
27 EPANPSEKNSPS	190
28 PANPSEKNSPST	191
29 ANPSEKNSPSTQ	192
30 NPSEKNSPSTQY	193
32 SEKNSPSTQYCY	194
33 EKNSPSTQYCYS	195

Brevemente, scans de peptídeo contendo peptídeos derivados de 12-mer CD20 foram marcados com anticorpos monoclonais. O padrão do anticorpo ligado ao peptídeo para peptídeos derivados de CD20 foi imobilizado por
5 transferência eletroquímica do complexo anticorpo-peptídeo em membranas PVDF. Eletro-transferência foi realizada em uma maneira fracionada em três membranas separadas PVDF (base alta para baixa). Os anticorpos monoclonais foram detectados com um anticorpo IgG anti-humano de cabra
10 rotulado com peroxidase e quimioluminescência.

Uma única região de ligação foi identificada em todas as três membranas. A ligação de mAbs 1.1.2 e 1.5.3 foi detectada nos peptídeos 27-30. O peptídeo que representa o epitopo comum foi determinado como sendo: NPSEKNSPS (Id. de
15 Seq. N°: 196). Esse peptídeo corresponde aos resíduos 171-179 do domínio extracelular de CD20.

O mapeamento de epitopo para o anticorpo 2.1.2 foi determinado por citometria de fluxo com o uso de células CHO que expressam construções de CD20 com mutações
20 direcionadas a sítio no domínio extracelular. Quatro linhas mutantes de CHO foram geradas. Uma única região de ligação foi identificada para as três mAbs.

EXEMPLO 16

ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIA DE REGIÃO EXTRACELULAR DE CD20

25 Relatos publicados indicam que anticorpos direcionados contra epitopos extracelulares em CD20 humana não ligam células B de camundongo. Os domínios extracelulares de CD20 humano e de camundongo diferem em 16 dos aproximadamente 43 aminoácidos. Oito diferenças não conservadoras estão
30 localizadas em um estiramento de 10 aminoácidos (ESLNFIRAHT

(Id. de Seq. N°: 197)), como indicado no alinhamento abaixo.

TABELA 15

ALINHAMENTO DE REGIÃO EXTRACELULAR DE CD20 HUMANA E DE
CAMUNDONGO

	Aminoácidos 142 - 184	
Humana	KISHFLKMESENFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCY	(Id. de Seq. N° 198)
Camund.	TL-----RR-EL-QTSK--VD--D---S-S-----N	(Id. de Seq. N° 199)

Essas diferenças na sequência de aminoácidos do domínio extracelular de CD20 de murídeo foram usadas como uma base para conduzir o estudo de mapeamento de epitopo acima. Uma estratégia de mutação foi designada, sendo que resíduos extracelulares na sequência de CD20 humana que diferem daqueles no camundongo foram recolocados com aqueles das posições equivalentes na sequência de murídeo.

EXEMPLO 17

MAPEAMENTO DE EPITOPO COM O USO DE MUTAGÊNESE DIRECIONADA A SÍTIO

Estudos de mapeamento de epitopo que usam uma abordagem de mutagênese indicaram que Alanina na posição 170 e Prolina na posição 172 estão envolvidas no reconhecimento de CD20 humana por anticorpos anti-CD20 conhecidos. A ligação de anticorpos conhecidos B1, 2H7, 1F5 e Rituximab foi anulada por mutação desses resíduos a Serina. A ligação de mAbs 2F2 a CD20 humana é insensível às mutações AxP e representa um epitopo de CD20 que envolve N163 e N166.

O epitopo de mAbs 1.1.2 e 1.5.3 foi mapeado para resíduos 171-179 (NPSEKNSPS (Id. de Seq. N°: 196)). A especificidade dessas mAbs à sequência humana é através de

Prolina 172. Alanina 170 não é necessária para ligação, como mostrado na Tabela 16 abaixo.

TABELA 16

ESPECIFICIDADE FINA DE MABS DE CD20

mAb	Especificidade	SPOTS	Id. de Seq. N°:	Resíduos críticos
B1	CD20 Humana	PANPSEKNSP	200	A170, P172
2H7	CD20 Humana			A170*, P172
IFS	CD20 Humana			A170*, P172
Rituximab	CD20 Humana			A170, P172
2F2	CD20 Humana			N163, N166
1.1.2	CD20 Humana	NPSEKNSPS	196	P172
1.5.3	CD20 Humana	NPSEKNSPS	196	P172
2.1.2	CD20 Humana			

5 * requisito mínimo para ligação. Poliak & Deans (2002); *Blood* 99:3256-62.

Anticorpos monoclonais anti-CD20 derivados de Xenouse® como aqui descrito têm epitopos de sobreposição, mas diferentes, de todos os anticorpos CD20 conhecidos.

10

EXEMPLO 18

USOS DE ANTICORPOS ANTI-CD20 PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS
QUE ENVOLVEM A EXPRESSÃO DE CD20

Os candidatos de anticorpo anti-CD20 líderes foram avaliados em um modelo de paralisia de membro posterior i.v. de Ramos. Cragg MS, Glennie, MJ (2004) *Blood* 103:2738-43. Mais especificamente, camundongos CB17 SCID foram injetados com 1×10^6 células de linfoma Ramos humanas na veia caudal e avaliados para o surgimento de paralisia do

membro posterior e sobrevivência. Grupos de animais foram tratados com os três anticorpos anti-CD20 candidatos líderes; um grupo tratado com Rituximab foi estabelecido como um controle de referência. Assim, seis grupos de sete
5 camundongos cada foram tratados por via i.p. (injeção intraperitoneal) com uma dose única de 0,05 mg/kg de anticorpo quinze dias após a inoculação da célula tumoral. Os seis grupos foram como se segue: controle de PBS (veículo), anticorpo de controle de isotipo de IgG1,
10 Rituximab, e os anticorpos anti-CD20 2.1.2, 1.3.3 e 1.1.2. Os pontos finais de sobrevivência médios e gerais foram monitorados. Nota: a sequência de anti-CD20 mAb 1.3.3 era idêntica àquela de mAb 1.5.3. Por razões de disponibilidade, mAb 1.3.3 foi usada como um substituto
15 para mAb 1.5.3.

Os resultados do estudo acima são mostrados na Figura 19 e demonstram que todos os três candidatos de anticorpo líder demonstram potente atividade anti-linfoma quando administrados como uma monoterapia de dose única. Além
20 disso, esse estudo revela que a sobrevivência geral de grupos tratados com os anticorpos 1.5.3 e 2.1.2 foi significativamente melhorada quando comparada ao controle de Rituximab. Análise estatística que compara o anticorpo 1.5.3 a Rituximab gerou um valor p de 0,022; análise que
25 compara o 2.1.2 a Rituximab gerou um valor p de 0,023. Portanto, esses achados demonstram uma melhoria estatisticamente significativa na sobrevivência geral em camundongos tratados com os anticorpos anti-CD20 1.5.3 e 2.1.2.

IMUNOTERAPIA COM O USO DE ANTICORPOS HUMANOS CONTRA CD20 EM
MODELOS DE TUMOR SUBCUTÂNEO

Eficácia em modelo subcutâneo de Daudi

Imunoterapia com mAb 1.5.3 e Rituximab foi avaliada em
5 camundongos CB17 SCID com células tumorais de Daudi (ATCC).
Brevemente, camundongos CB17 SCID foram obtidos de Charles
River laboratories, Wilmington, MA, USA e mantidos sob
condições livres de patógenos. 107 células Daudi foram
injetadas por via subcutânea e deixadas para formar
10 tumores. Tratamentos foram iniciados quando o tamanho médio
do tumor atingiu 200 mm³. Cada anticorpo, 2.1.2, 1.1.2,
1.5.3 e Rituximab, foi testado em 2 níveis de dose, 1 mg/kg
e 5 mg/kg, e comparado ao controle de veículo e um controle
de isotipo de IgG1. A dosagem dos anticorpos anti-CD20,
15 controle de isotipo e controle de veículo PBS foi feita por
injeção intraperitoneal duas vezes por semana por 3 semanas
e foi iniciada no dia 18 após a inoculação do tumor.

Os resultados do estudo acima são mostrados na Figura
20 e na Tabela 17 abaixo. Todas as mAbs demonstraram
20 potente eficácia antitumoral. mAbs 1.5.3 e 1.1.2 foram as
mais potentes na inibição do crescimento de tumores de
Daudi, com 95% ($p < 0,001$) de inibição do crescimento tumoral
na dose de 5 mg/kg em relação a 71% de inibição para
Rituximab. Análise estatística que compara 1.5.3 ou 1.1.2 a
25 Rituximab gerou um valor p abaixo de 0,05 em um teste-t de
Student, indicando uma melhoria significativa na eficácia
com mAbs 1.1.2 e 1.5.3. A regressão completa e
sobrevivência livre de tumor foi observada em 10% e 20% dos
camundongos tratados com a maior dose de mAbs 1.5.3 e
30 1.1.2, respectivamente.

Tabela 17

Det. de grupo	Tempo de duplic. De tumor (TD)	Retardo de cresc. (GD)	Morte cel. Log (LCK)	T/C %	Teste t uma cauda P	% de ini-biçao	S.D> log (Vf/vi)	% de Perda max. de peso	% de regressão	Regressão completa	Sobrev. Livre de Tumor
	[todos]	[1.000,0 mm³]				[Iniciar Dia 18 Interromper Dia 35]			[T/C <= -50,0%]	[Tamanho <= 63,0 mm³]	[dias >= 14]
PBS	4,607	-	-	-	-	-	0,08463	0%	-	-	-
IgG1-ctr	-	-0,4	-0,029	95	0,21909	13	0,06266	0%	0%	0%	0%
Rituxan-1 mpk	-	1,8	0,115	61	0,001727	46	0,14526	0%	0%	0%	0%
Rituxan-5mpk	-	9,0	0,591	31	0,0	71	0,10263	0%	0%	0%	0%
2.1.2-1mpk	-	0,9	0,057	73	0,037602	36	0,15279	-1%	0%	0%	0%

2.1.2- 5mpk	-	8,4	0,547	34	0,0	70	0,11548	-1%	0%	0%	0%
1.1.2- 1mpk	-	3,3	0,215	48	2,0E-6	55	0,15718	0%	0%	0%	0%
1.1.2- 5mpk	-	-	-	6	0	95	0	0%	30%	20%	20%
1.5.3- 1mpk	-	4,4	0,288	47	8,14E-4	59	0,24263	0%	0/10	0%	0%
1.5.3- 5mpk	-	24,6	1,608	5	0,0	95	0	-2%	10%	10%	10%

Eficácia em modelo subcutâneo de Namalwa

Um projeto experimental similar foi usado para avaliar a eficácia de anticorpo humano anti-CD20 no modelo de Namalwa de linfoma não Hodgkin. 107 células de Namalwa (ATCC) foram implantadas por via subcutânea em camundongos atímicos Ncr (Taconics, Germantown, NY, USA). As células de Namalwa formaram tumores agressivos que expressam menor nível de CD20. O tratamento foi iniciado quando os tumores atingiram um tamanho médio de 100 mm³. Os anticorpos foram testados em níveis de dose de 10 e 20 mg/kg de anticorpos anti-CD20, e comparados a controle de veículo e um controle de IgG1 de isotipo. A dosagem de anticorpos anti-CD20, controle de isotipo e controle de veículo de PBS foi feita por injeção intraperitoneal duas vezes por semana por 3 semanas e foi iniciada no dia 9 após a inoculação do tumor. Como mostrado na Figura 21 e na Tabela 18 abaixo, Rituximab e mAb 1.5.3 são equivalentes na dose mais alta de 20 mg/kg mediando uma inibição de crescimento tumoral de 78 e 73% ($p < 0,001$), respectivamente. No entanto, em uma dose de 10 mg/kg, 1.5.3 foi dramaticamente mais potente que a mesma dose de Rituximab. Rituximab não foi eficaz, enquanto mAb 1.5.3 ainda apresentava 65% de inibição de crescimento tumoral ($p < 0,05$).

Tabela 18

Det. de grupo	Tempo de duplic. de tumor (TD)	Retardo de cresc. (GD)	Morte cel. Log (LCK)	T/C %	Teste t uma cauda p	% de ini- bição	S.D> log (Vf/Vi)	% de Perda max. de peso	regressão	Regressão completa
	[todos]	[1.000,0 mm ³]				[Iniciar Dia 9 Interromper Dia 23]			[T/C <= -50,0%]	[Tamanho <= 63,0 mm ³]
PBS	3,399	-	-	-	-	-	NaN	0%	0/10	0/10
IgG1	-	0,6	0,053	85	0,212797	2	NaN	0%	0%	0%
RTX-10mpk	-	0,2	0,015	88	0,498394	5	NaN	0%	0%	0%
RTX-20mpk	-	N/A	N/A	22	5,76E-4	78	NaN	0%	80%	80%
1.5.3- 10mpk	-	N/A	N/A	32	0,023883	65	NaN	0%	40%	40%
1.5.3- 20mpk	-	N/A	N/A	28	0,005959	73	0,44054	0%	40%	30%

Eficácia em modelo subcutâneo de RR1-Raji

A eficácia de anticorpos anti-CD20 humanos em um modelo de células resistente a Rituximab foi também avaliada. 107 RR1-Raji foram implantadas por via subcutânea em camundongos receptores CB17 SCID. Anticorpos foram testados em dois níveis de dose, 1 mg/kg e 5 mg/kg, e comparados ao controle de veículo e a um controle de isotipo de IgG1. A dosagem dos anticorpos anti-CD20, controle de isotipo e controle de veículo PBS foi feita por injeção intraperitoneal duas vezes por semana por 3 semanas e foi iniciada no dia 14 após a inoculação do tumor. Rituximab em uma concentração de 5 mg/kg foi eficaz em modelo de RR1-Raji mediando 59% de inibição de crescimento tumoral, similar aos 62% atingidos por mAb 1.5.3 (Figura 22). Em dose de 1 mg/kg semanalmente, o anticorpo 1.5.3 pareceu mais potente que Rituximab, embora a diferença não atingisse significância estatística ($p=0,058$).

Tabela 19

Det. de grupo	Tempo de duplic. de tumor (TD)	Retardo de cresc. (GD)	Morte cel. Log (LCK)	T/C %	Teste t uma cauda P	% de ini- bição
	[todos]	[900,0 mm ³]		[Iniciar dia 14 Finalizar]		
PBS	6,334	-	-	-	-	-
IgG1 @ 5mpk	-	-2,1	-0,1	120	0,249902	-9
Rituxan @ 1mpk	-	1,7	0,082	81	0,086581	20

Rituxan @ 5mpk	-	6,6	0,313	49	0,021599	59
1.5.3 @ 1mpk	-	4,8	0,229	61	0,009539	45
1.5.3 @ 5mpk	-	9,9	0,473	42	9,18E-4	62

Eficácia em modelo subcutâneo de RR6-Ramos

O modelo de RR6-Ramos foi então experimentado *in vivo*. 107 células RR6-Ramos foram implantadas por via subcutânea em camundongos receptores CB17 SCID. Os camundongos foram tratados com 1 ou 5 mg/kg de 2.1.2, 1.5.3 ou Rituximab e a eficácia antitumor foi comparada ao controle de veículo PBS ou a um controle de isotipo de IgG1. A dosagem dos anticorpos anti-CD20, controle de isotipo e controle de veículo PBS foi feita por injeção intraperitoneal duas vezes por semana por 3 semanas e foi iniciada no dia 14 após a inoculação do tumor. A Figura 23 e a Tabela 20 demonstram que mAbs 2.1.2 e 1.5.3 inibiram o crescimento tumoral em 61% e 59% ($p < 0,05$), respectivamente, enquanto Rituximab não mediou qualquer efeito antitumor significativo nesse modelo.

Tabela 20

Det. de grupo	Tempo de duplic. de tumor (TD)	Retardo de cresc. (GD)	Morte cel. Log (LCK)	T/C %	Teste t uma cauda P	% de ini- bição
	[todos]	[1.000,0 mm ³]		[Iniciar dia 14 Finalizar]		

IgG1 @ 5mpk	3,823	-	-	-	-	-
Rituxan @ 1mpk	-	-0,4	-0,029	97	0,382272	17
Rituxan @ 5mpk	-	0,9	-0,068	72	0.019239	26
2.1.2 @ 1mpk	-	4,3	0,337	40	2,05E-5	64
2.1.2 @ 1mpk	-	3,1	0,244	46	1,5E-5	61
1.5.3 @ 1mpk	-	3,4	0,27	44	7,53E-4	59
1.5.3 @ 5mpk	-	2,8	0,221	48	6,05E-4	59

EXEMPLO 20

DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B TECIDUAIS APÓS TRATAMENTO COM
ANTICORPOS HUMANOS CONTRA CD20

O grau de identidade/homologia de aminoácido entre
5 CD20 de macaco cinomolgus e CD20 humana é presumivelmente
alto uma vez que vários anticorpos anti-CD20 humanos
comercialmente disponíveis reagem de forma cruzada com
linfócitos B de macaco cinomolgus. Um total de vinte e seis
macacos cinomolgus machos foram rastreados antes do início
10 do estudo, para a proporção de linfócitos B circulantes
(CD20+ células). Os animais que mostram prevalência
extrema/não usual de células CD20+ em cada lado da
distribuição de subpopulação foram excluídos. Vinte e
quatro animais foram selecionados como um resultado do
15 processo de rastreamento, separados por peso corporal, e
designados a três grupos, cada um consistindo em seis

macacos cinomolgus machos. Após um período de aclimatização de 14 dias, os grupos foram tratados por via intravenosa, nos dias de Estudo 1, 8 e 15, com veículo (Grupo 1, 0 mg/kg), Rituximab (Grupo 2, 10 mg/kg), como um controle
5 positivo, e mAb 1.5.3, 10 mg/kg.

Parâmetros avaliados incluíram observações clínicas, peso corporal, consumo de alimentos, hematologia, análise FACS de sangue periférico e tecidos linfóides, concentrações de artigo de teste no soro (farmacocinética),
10 patologia bruta, pesos dos órgãos, histopatologia e imunohistoquímica. Todos os animais sobreviveram até a necropsia terminal agendada no dia 18 do estudo.

Nenhuma mudança atribuível ao tratamento com controle positivo (Rituximab) ou o artigo de teste (mAb 1.5.3) foi
15 aparente nas observações clínicas, consumo de alimentos, pesos corporais ou patologia bruta. Como esperado, houve efeitos marcantes relacionados ao artigo de teste sobre as contagens totais de linfócitos no sangue tão precocemente quanto 1 hora após a infusão bem como outras mudanças
20 esperadas na hematologia. Os resultados de citometria de fluxo demonstraram uma profunda depleção em percentagens relativas de linfócitos B positivos em relação aos valores de base em subconjuntos CD 19+ e CD20+ para o grupo 2 (Rituximab), e grupo 3 (mAb 1.5.3) em doses equivalentes no
25 sangue. Macacos tratados com mAb 1.5.3 mostraram os efeitos mais pronunciados que ocorreram imediatamente após a dosagem com níveis de células B reduzidos permanecendo em aproximadamente >1% do valor de base ao final do estudo no dia 18.

30 Adicionalmente, os resultados das análises FACS de

células isoladas de linfonodos de vários locais (linfonodos mesentéricos, inguinais e auxiliares), medula óssea e baço demonstraram as maiores diferenças ($P < 0,05$) entre grupo 3, animais tratados com mAb 1.5.3 e o grupo de controle (Figura 24). Os efeitos observados com mAb 1.5.3 foram mais pronunciados que aqueles observados com Rituximab em doses equivalentes (Figura 24). Essas mudanças incluíram depleções mínimas a marcantes de células B nos folículos e na zona marginal (baço) e aumentos relativos e/ou absolutos em células T nas bainhas linfóides periarteriolas (PALS) e paracórtex. No geral, nenhum achado adverso atribuído à administração do artigo de teste foi observado nesse estudo. Todas as mudanças relacionadas ao artigo de teste observadas nos animais de estudo foram consistentes com a atividade farmacológica de anticorpos anti-CD20+ com anticorpo AB 1 demonstrando os efeitos mais potentes.

EXEMPLO 21

Pacientes humanos com linfoma não Hodgkin são tratados com mAb 1.5.3 aqui descrita. Cada paciente é dosado semanalmente com uma quantidade eficaz do anticorpo variando de 50 mg/m² a 2.250 mg/m² por 4-8 semanas. Em momentos periódicos durante o tratamento, cada paciente é monitorado para determinar o número de células de linfoma no paciente. Constatou-se que, em pacientes que se submetem a tratamento com a mAb 1.5.3, o número de células de linfoma é reduzido em comparação aos pacientes de controle que não recebem o anticorpo mAb 1.5.3.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

Todas as referências aqui citadas, que incluem patentes, pedidos de patentes, trabalhos, livros texto, e

outros, e as referências aqui citadas, na extensão em que elas ainda não o são, são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

EQUIVALENTES

- 5 A especificação escrita antecedente é considerada como sendo suficiente para permitir que uma pessoa habilitada na técnica pratique a invenção. A descrição anterior e os exemplos detalham certas modalidades preferidas da invenção e descrevem o melhor modo contemplado pelos inventores.
- 10 Deve-se observar, no entanto, que não importa quão detalhado o antecedente possa aparecer no texto; a invenção pode ser praticada em várias formas e a invenção deve ser interpretada de acordo com as reivindicações em apêndice e quaisquer equivalentes desta.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> GAZIT-BORNSTEIN, Gadi
 GREEN, Larry L.
 YANG, Xiaodong
 QUEVA, Christophe
 BLAKEY, David Charles

<120> ANTICORPOS DIRECIONADOS A CD20 E USOS DOS MESMOS

<130> ABXAZ.003A

<150> US 60/686,992

<151> 2005-06-02

<160> 202

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 368

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
aggccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcac caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacaccct 300
tcctatgggt cggggagtc caactttgac tactgggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctcagc                                     368

```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 427

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgga gcccgcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatctt ataagatttc taaccgggtc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgcgggggtt tattactgca tgcaagctat acaatttccg 300
atcaccttcg gccaaggac acgactggag attaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 420
ctgaata

```

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagaatgggg 300
gatttttgga gtggttatta taccagaggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cagc

```

<210> 6

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

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

```

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Met Gly Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Thr Arg Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 323
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccagactcct catctctggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcaccag tataatgact ggtctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acg 323

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Asn Asp Trp Ser Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc aactactgga tcgtctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcgtac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt actactgtgc gagacatgga 300
 gattactact actactacgg tatggacgctc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 10
 <211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

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

```

<210> 11

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

gatattgtga tgaccagac cccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca acgcctcgta cacagtgatg gacacaccta tttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ctaagggttc taaccggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggatt tattactgca tgcaagctac acaatttccg 300
ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacg 338

```

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 368

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
tccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatat attactgtgc gagacaccct 300
tcctatggtt cgggggagtc caactttgac tactgggggc agggaaaccct ggtcaccgtc 360
tcctcagc                                     368

```

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

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

```

<210> 15

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

gatattgtga tgaccagac tcctctctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctatcttt ataagatttc taatcggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgctgggggt tattactgcg tgcaagctac acaatttcct 300
ctcactttcg gcggaggag caaggtggag atcaaacg                                     338

```

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

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

```

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	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	Val	Gln	Ala
			85					90						95	
Thr	Gln	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 17
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacaaggg 300
 gattactacc actattccgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 365
 tcagc

<210> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Asp Tyr Tyr His Tyr Ser Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ttgtccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacaatgatg gagacaccta cttgaattgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg ctcttaattt ataaggtttc taactgggac 180
 tctgggggtcc ccgacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaagtc 240
 agcagggtgg aagctgagga tggtgggggt tattactgca tgcaaggtag acactggcct 300
 ctcactttcg gcggaggag caaggtggag atcaaacg 338

<210> 20
 <211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 365

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt ggcgcagatg 120
ccccggaaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactaggg 300
gattactata actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tcagc                                     365

```

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

```

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

```

<210> 23

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

```

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaaaaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagagttc taaccgggtc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgcg tgcaagctac acaatttcct 300
atcaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaacg 338

```

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

```

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

```

<210> 25

<211> 368

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgtcct tccaaggcca ggccaccatc tcagccgaca agtccatcac caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagacaccct 300
tcctatggtt cggggagtc caactttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctcagc 368

```

<210> 26

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

```

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

```

65					70					75				80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr
				85					90					95
Ala	Arg	His	Pro	Ser	Tyr	Gly	Ser	Gly	Ser	Pro	Asn	Phe	Asp	Tyr
			100					105					110	Trp
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120							

<210> 27

<211> 326

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagttact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgtatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cactatggta cctcacctcg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacg                                     326

```

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

<210> 29

<211> 368

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt ggcagagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcac caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagacaccct 300
tcctatggtt cggggagtc caactttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctcagc                                     368

```

<210> 30

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

```

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

```

<210> 31

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

```

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatatt ataagatttc taaccgggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgcg tgcaagctac acaatttcct 300
ctcacttttcg gcggaggggac caaggtggag atcaaacg 338

```

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

```

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

```

<210> 33

<211> 365

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagacatggt 300
 gactacagta acattgatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tcagc 365

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Gly Asp Tyr Ser Asn Ile Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 332
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacgccta cttgaattgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agaaggggtgg aggctgagga tgttggggct tattactgca tgcaaggat acactgcact 300
 ttcggccctg ggaccaaagt gcatatcaaa cg 332

<210> 36
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Ala Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp 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
Arg	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln Gly
				85					90					95
Ile	His	Cys	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	His	Ile	Lys	
			100					105					110	

<210> 37
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaactgga 300
 actacggact actactccgg tatggacgctc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 38
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Thr Gly Thr Thr Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacacctt cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaacttac tcaatttccg 300
 ctcactttcg gcggaggag caaggtggag atcagacg 338

<210> 40
 <211> 112
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

```

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

```

<210> 41

<211> 368

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccatcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacatggg 300
gatttttgga gtggttatta ttcttttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctcagc                                     368

```

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

```

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

```

<210> 43

<211> 341

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43
 gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
 tttcagcaga gccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaggtag acactggcct 300
 tcgatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaaac g 341

<210> 44
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp 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 Gly
 85 90 95
 Thr His Trp Pro Ser Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 45
 <211> 368
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 gaggtgcagt tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagacagggc 300
 gatttttggga gtggttatgg gggatatggac gtctggggcc aaggggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctcagc 368

<210> 46
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Gly Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 47
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 gatattgtga tgaccagac tccacactcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atatcctgca ggtctagtca aagcctcgta tccagagatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagatttc taaccgggttc 180
 tctgggggtcc caaacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtga aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acagtttccc 300
 ctcaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaacg 338

<210> 48
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro His Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Ser Arg
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Lys Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 49
 <211> 368
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 gaggtgcagt tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccaaatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacagggc 300
 gattttctgga gtggtaatgg gggatatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgctc 360
 tcctcagc 368

<210> 50
 <211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

```

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

```

<210> 51

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

```

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tccagagatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatatt ataagatttc taaccgggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagttgagga tgtcggcggt tattactgca tgcaagctac acaatttccc 300
atcaccttcg gccaggggac acgactggag attaaacg 338

```

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

```

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

```

<210> 53

<211> 371

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53
gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccggaag gcttgagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacatggt 300
gattactatg cttcggagag ttctgctttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc 360
gtctcttcag c 371

<210> 54
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Gly Asp Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ser Ala Phe Asp Ile
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 55
<211> 338
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 55
gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacacctt cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggttg aagctgagga tgtcgggggt tattactgca tgcaaggtag acaatttcct 300
ctcacttttcg gcggaggag caaggtggag atcaaacg 338

<210> 56
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	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	Gly
			85					90						95	
Thr	Gln	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 57
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 57
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcgactgggt ggcgcagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatgggggtcc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacaggga 300
 gcttcgggggt actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 58
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asp Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Ala Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 59
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 gatattgtga tgacccagag tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtatagtca aagcctcgta cacagggatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcgtaattc ataagatttc taaccgggtc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggttg aagctgagga tgctgggttt tattactgca tgcaaactac acaatttccg 300
 ctcaatttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacg 338

<210> 60
 <211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

```

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

```

<210> 61

<211> 353

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcacgg cttctgggta cagtttttcc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatgggtc cacacgctat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg acctcagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagccagc 300
agctgggtatt ttgactgctg gggccaggga accctgggtc ccgtctcctc agc 353

```

<210> 62

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

```

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 Thr Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser 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 His Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Leu
          50           55           60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Ala Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 63

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63
gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagatttc taaccgggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttcgc 300
ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacg 338

<210> 64
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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
Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 65
<211> 353
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 65
cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccggggcag agtcaccatg accacagaca cattcacgag cacagccgac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagcgctg 300
acagctatgg gtgactactg gggccaggga accctgggtc ccgtctcctc agc 353

<210> 66
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
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 Asn Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Phe Thr Ser Thr Ala Asp
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[illegible]

```
<210> 67
<211> 338
<212> DNA      .
<213> Homo sapiens
```

<400>	67						
gagattgtga	tgaccagac	tccactctcc	tcacctgtca	cccttggaca	gccggcctcc	60	
atctcctgca	agtctagtca	aagcctcgta	cacagtgatg	gaaacaccta	cttgagttgg	120	
cttcagcaga	ggccaggcca	gcctccaaga	ctcctaattt	ataagatttc	taaccggttc	180	
tctgggggtcc	cagacagatt	cagtggcagt	ggggcaggga	cagatttcac	actgaaaatc	240	
agcagggtgg	aagctgagga	tgtcgggggt	tattactgca	tgcaaactac	atactttccg	300	
ctcacttttc	gcggaggga	caaggtagag	atcaaacg			338	

```
<210> 68
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 68															
Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Pro
			35				40					45			
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55				60					
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	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	Thr
				85					90					95	
Thr	Tyr	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

```
<210> 69
<211> 371
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400>	69						
gaggtgcagc	tgggtgcagtc	tggagcagag	gtgaaaaagc	cgggggagtc	tctgaagatc	60	
tcctgtaagg	gttctggata	cagttttacc	aactactgga	tcgcctgggt	gcgccagatg	120	
cccgggaaag	gcctggagtg	gatggggatc	atcttttctg	gtgactctga	taccagatac	180	
agccggcctt	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	agtccatcag	caccgcctac	240	
ctacattgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccatgt	attactgtgc	gagacataga	300	
gattatacca	gtggcggacc	ggatgctttt	gatgtctggg	gccaaaggac	aatgggtcacc	360	
gtctcttcag	c					371	

```
<210> 70
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 70

```

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

```

<210> 71

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 71

```

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcaccaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccgggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg aggctgagga tgctgggctt tattactgca tgcaaactac acaatttcct 300
ctcacttttcg gcggaggac caaggttaag atcaaacg                               338

```

<210> 72

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

```

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

```

<210> 73

<211> 365

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 73

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

```

```

tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120
ccccggaaaag gcctggagtg gatgggaatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcaacctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gaggactggg 300
agctactaca actactgcgg gatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tcagc                                     365

```

<210> 74

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

```

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

```

<210> 75

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 75

```

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctctctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccataattt ataagctttc taaccgggtc 180
tctgggatcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg aagctgagga tgctgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccc 300
ctcacttttcg gcggaggga caaggtggag atcaaacg                                     338

```

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

```

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

<210> 77
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata tagtttcacc aattactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtac gagacagggg 300
 gattactatg atagtagtg ccctgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 78
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gln Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Pro Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 79
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 79
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgagca gccggcctcc 60
 atttcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagagatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatcctg ataagatttc taaccgggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttcct 300
 ctcaatttcg gcggaggag caaggtggag atcaaacg 338

<210> 80
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

```

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

```

<210> 81

<211> 347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 81

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgcggggaggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggcatg atggaagtaa aaaatactat 180
gaagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ttgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaggaactgg 300
ttctttgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctcagc 347

```

<210> 82

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Ala 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 His Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Glu 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 Asn Trp Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
          100          105          110
Val Ser Ser
          115

```

<210> 83

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

```

aaaattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

```

```

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
tttcagcaga ggccaggcca gctccaaga ctcctaatta ataagatttc taaccggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgctggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttcct 300
ctcactttcg gcggaggac caaggtggag atcaaacg 338

```

<210> 84

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

```

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

```

<210> 85

<211> 368

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtactac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctc 300
tactacggtg gtaactcgta ctactttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctcagc 368

```

<210> 86

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

```

Gln 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 Asp Tyr
          20           25           30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Thr Thr 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           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Asp Leu Tyr Tyr Gly Gly Asn Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

```

100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 87
 <211> 326
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 87
 tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
 acatgccaaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
 caggcccttg tacttgatcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagcccga 180
 ttctctggct ccgactcagg aaacacagct tccttgacca tcaactggggc tcaggcggaa 240
 gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagt gtaaccatgt ggtattcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt cctagg 326

<210> 88
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asp Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 89
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 89
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag aaccgcctac 240
 ctgcagtggg gcagcctgaa ggccctcggac accgccatgt attactgtgc gagaattggg 300
 gatcactacc attacaacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 90
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

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

<210> 91
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 91
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgtc cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctacttt ataagaattc taaccgggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggt tattactgca tgcaagctac acaatttccg 300
 ctctctttcg gcggaggtag caaggtggag atcaaacg 338

<210> 92
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Leu Tyr Lys Asn Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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
Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 93
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 93
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagcttttcc agctactgga tcaactgggt gcgtcagatg 120
 cccgggaaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180

agccccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag taccgcctac 240
 ctgcagtggc gcagcctgaa ggcctcggac accgccattt attattgtgc gagagtagga 300
 gattactact cctactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 94

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

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

<210> 95

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 95

gatattgtga tgaccagac tccaccctcc tcacctgtca cccgtggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaaaaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagatttc taaccgggttt 180
 tctgggggtcc caggagatt cagtggcagt ggggagaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttcct 300
 ctcaatttcg gcggaggag caaggtggag atcaaacg 338

<210> 96

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

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

100

105

110

<210> 97
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 97
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc aactactgga tcaactgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcaa caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcggac accgccatgt attactgtgc gagacaggga 300
 ggacactact actactccgg tatggacgtc tgggggtcaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 98
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 98
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Gly His Tyr Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 99
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 99
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtcgcgtca aagcctccta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagctttc taaccggggtc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaatctac acaatttccg 300
 ctcactttcg gcggaggac caaggtgaag atcaaacg 338

<210> 100
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 100
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly

1		5		10		15									
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Arg	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
		20						25					30		
Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Pro
		35					40					45			
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Leu	Ser	Asn	Arg	Val	Ser	Gly	Val	Pro
		50				55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	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	
Thr	Gln	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Lys	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 101
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctagaaa cagctttacc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga tacgagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag taccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gcgaactggg 300
 agctactcct actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 102
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 103
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 gatattgtga tgacccagac tccaactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgata gaaataccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagggttc taaccgggttc 180
 tctgggggtcc cagaaagatt cagtggcagt gggacaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggttg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgcg tgcaagaaac actatttccc 300
 atcaccatcg gccaggggac acgactggag attaaacg 338

<210> 104

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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

<210> 105

<211> 365

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 105

gggggtgcagc tgggttcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagttttacc agctactgga tcggctgggt ggcagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcttg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccaaggcca ggtcatcatt tcagccgaca agtccatcag taccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaactggg 300
 gattactact cctaccacgg aatggacgctc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 106

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107
<211> 338
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 107
gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacacctt tttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagatttc taatcgcttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgtcgggatt tattactgca tgcaagctac acaatttccg 300
ctcacttttcg gcggaggggac caaggtggag atcaaacg 338

<210> 108
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 109
<211> 374
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 109
gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagt ccgggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc aacttctgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccacctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagacatcct 300
ccttatagtg ggagctacta cgctgatgct tttgatatct ggggccaaagg gacaatggtc 360
accgtctctt cagc 374

<210> 110
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Ser Gly Glu
1 5 10 15

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

<210> 111
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 111
 gatattgtgc tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gacacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccgggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg gagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccg 300
 ctcactttcg gcggaggac caaggtggag atcaaacg 338

<210> 112
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 112
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly His Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Gly Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 113
 <211> 374
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 113
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagttttacc agcttctgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccgaggcct ggtaaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcactgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatct tttactgtgc gagacatcct 300
 ccttatagtg ggagctacta cgctgatgct tttgatatct ggggccaagg gacaatgggc 360
 accgtctctt cagc 374

<210> 114
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 114
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Phe
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Arg Gly Leu Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Pro Pro Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ala Asp Ala Phe Asp
 100 105 110
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 115
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 115
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta agcagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagatttc taacctattc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaagatc 240
 agcagggtgg aagctgagga tgtcgggctt tattactgca tgcaagctac acaatttccg 300
 ctcaatttcg gcggaggac caaggtggag atcaaacg 338

<210> 116
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 116
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Ser Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Leu Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 117
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 117
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaactggg 300
 gattaccaca actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 118
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 118
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Thr Gly Asp Tyr His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 119
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 119
 gatattgtga tgaccagag tccactctcc tcacctgtca cccttgga gcccgcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacacctt cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatatt ataagatttc taaccggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aagctgagga tgctgggggtt tattactgca ttcaagctac acaatttccg 300
 ctcaatttcg gcggagggac caaggaggag atcaaacg 338

<210> 120
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 120
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

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

<210> 121
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 121
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agttactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg ctgactctga taccagatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccctcaa caccgcctac 240
 ctgcagtggc gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt actactgtgc gagaattggt 300
 gacttctact actattccgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 122
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 122
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Leu Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Arg Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ile Gly Asp Phe Tyr Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 123
 <211> 341
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 123
 gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctcgtca aagcctcgta tacagtgatg gaagcaccta cttgaattgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctcattt ataaggtttc taactgggac 180

tctgggggtcc cagacagatt cagcgccagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aggctgagga tgatgggggtt tatcactgca tgcaaggtac acactggcct 300
 ttgctcgctt tcggcggagg gaccaagggtg gagatcaaac g 341

<210> 124

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

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

Lys

<210> 125

<211> 365

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 125

gagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata catctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctcct tccaaggcca gatcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtgc gagagtggga 300
 actactaact actactacgg tatggacgctc tggggccaag ggacctcggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 126

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

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

100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 127
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 127
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacacctt cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagatttc taaccgggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac gcagtttccg 300
 ctcaatttcg gcggaggcac caaggaggag atcaaacg 338

<210> 128
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 128
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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
 Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 129
 <211> 365
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 129
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcttgtaagg gttctggata cagctttacc acctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagaattggg 300
 gattactact cctattccgg tttggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagc 365

<210> 130
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 130
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

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

<210> 131
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 131
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gacacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctatttt ataagatttc taaccgggtc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgctgggatt tattactgca tgcaagctac acagtttccg 300
 ctacttttcg gcggaggagc caaggtggac atcaaacg 338

<210> 132
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 132
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asp Gly His Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Phe Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 133
 <211> 368
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 133
 caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctgatgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
 acctgtgccca tctccgggga cagtgtctca agcaacagtg tttcttggaa ctggatcagg 120
 cagtcacccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtt taagtggttt 180

aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240
 cagttctccc tgcgactgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctctgta ttactgtgca 300
 agaatagata tctggaacga cgtctttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctcagc 368

<210> 134

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

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

<210> 135

<211> 347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 135

cagcctgtgc tgactcagcc aacttcacctc tcagcatctc ctggagcatc agccagactc 60
 acctgcacct tgcgcagtgg catcaatctt ggtagctaca ggatattctg gtaccagcag 120
 aagccagaga gccctccccg gtatctcctg agctattatt cagactcaag aaagcatcag 180
 ggctctggag tccccagccg cttctctgga tccaaagatg cttcgagcaa tgcagggatt 240
 ttagtcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat tttttggcac 300
 agcagtgcctt gggatttcgg cggaggggacc aagttgaccg tcctagg 347

<210> 136

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

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

100 105 110
 Thr Val Leu
 115

<210> 137
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 137
 tcaggagttt tgagagcaaa atg 23

<210> 138
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 138
 aacagaagaa atcacttaag gag 23

<210> 139
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 139
 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 Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 140
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 140
 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 Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 141
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 141
 Gln 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 Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr 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 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Gly Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 142
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 142
 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
 100 105 110

<210> 143
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 143
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

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

<210> 144

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

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

<210> 145

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 146
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 147
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 147
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 148
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

[illegible]

```
<210> 149
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

[illegible]

```
<210> 150
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

[illegible]

<210> 151
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 151
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Thr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 152
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 152
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Ser Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 153
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 153
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35					40					45					
Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
50					55					60					
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
85					90					95					
Ala	Arg	Tyr	Ser	Ser	Gly	Ala	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met
100					105					110					
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
115															

```
<210> 154
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

[illegible]

```
<210> 155
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 155															
Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	Ser
			20					25					30		
Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Trp	Asp	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	Gly
				85					90					95	
Thr	His	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys				
			100					105							

```
<210> 156
<211> 112
```

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

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

<210> 157

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

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

<210> 158

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

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

100 105 110

<210> 159
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 159
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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
 Thr Gln Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 160
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 160
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Thr Phe
 85 90 95
 Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 161
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 161
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 162
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 162
 Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Leu Gly Ser
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Ser Pro Pro Arg Tyr
 35 40 45
 Leu Leu Ser Tyr Tyr Ser Asp Ser Ser Lys His Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ser Asn Ala Gly Ile
 65 70 75 80
 Leu Val Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Met Ile Trp His Ser Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110
 Val Leu

<210> 163
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 163
 Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn
 1 5 10

<210> 164
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 164
 Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe
 1 5 10

<210> 165
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 165
 Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile
 1 5 10

<210> 166
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 166
 His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg
 1 5 10

<210> 167
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 167
 Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala
 1 5 10

<210> 168
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 168
 Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His
 1 5 10

<210> 169
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 169
 Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr
 1 5 10

<210> 170
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 170
 Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
 1 5 10

<210> 171
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 171
 Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr
 1 5 10

<210> 172
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 172
 Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile
 1 5 10

<210> 173
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 173
 Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 174
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 174
 Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile
 1 5 10

<210> 175
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 175
 Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr
 1 5 10

<210> 176
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 176
 Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn
 1 5 10

<210> 177
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 177
 Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys
 1 5 10

<210> 178

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

<400> 178
 Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu
 1 5 10

<210> 179
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 179
 His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro
 1 5 10

<210> 180
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 180
 Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala
 1 5 10

<210> 181
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 181
 Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn
 1 5 10

<210> 182
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 182
 Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro
 1 5 10

<210> 183
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 183
 Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser
 1 5 10

<210> 184
 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184

Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu
1 5 10

<210> 185

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 185

Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys
1 5 10

<210> 186

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
1 5 10

<210> 187

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 187

Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser
1 5 10

<210> 188

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 188

Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro
1 5 10

<210> 189

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser
1 5 10

<210> 190

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 190

Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr
1 5 10

<210> 191

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln
1 5 10

<210> 192

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 192

Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr
1 5 10

<210> 193

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys
1 5 10

<210> 194

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr
1 5 10

<210> 195

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 195

Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser
1 5 10

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser

1

5

<210> 197

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr

1

5

10

<210> 198

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala

1

5

10

15

His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser

20

25

30

Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr

35

40

<210> 199

<211> 43

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 199

Thr Leu Ser His Phe Leu Lys Met Arg Arg Leu Glu Leu Ile Gln Thr

1

5

10

15

Ser Lys Pro Tyr Val Asp Ile Tyr Asp Cys Glu Pro Ser Asn Ser Ser

20

25

30

Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Asn

35

40

<210> 200

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro

1

5

10

<210> 201

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly

1

5

10

<210> 202

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

REIVINDICAÇÕES

1. Agente de ligação direcionado que se liga a CD20 sendo caracterizado por compreender uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 1 (CDR1) 5 que tem uma seqüência de aminoácidos de GYSFTSYWIG (Id. de Seq. N°: 201).
2. Agente de ligação direcionado que se liga a CD20 sendo caracterizado por compreender uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve 2 (CDR2) 10 que tem uma seqüência de aminoácidos de KISNRFS (Id. de Seq. N°: 202).
3. Agente de ligação direcionado que se liga a CD20, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado tem uma EC₅₀ de não mais que 0,5 µg/ml para 15 indução de apoptose das células de Ramos em um ensaio de viabilidade padrão CellTiterGlo.
4. Agente de ligação direcionado, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado tem uma EC₅₀ de não mais que 0,2 µg/ml 20 para indução de apoptose das células de Ramos em um ensaio de viabilidade padrão CellTiterGlo.
5. Agente de ligação direcionado, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado tem uma EC₅₀ de não mais que 0,02 µg/ml 25 para indução de apoptose das células de Ramos em um ensaio de viabilidade padrão CellTiterGlo.
6. Agente de ligação direcionado que se liga a CD20, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado tem uma EC₅₀ de não mais que 0,2 µg/ml para 30 indução de apoptose das células de Ramos em um ensaio de

viabilidade padrão Alamar Blue.

7. Agente de ligação direcionado, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado tem uma EC_{50} de não mais que 0,09 $\mu\text{g/ml}$ para indução de apoptose das células de Ramos em um ensaio de viabilidade padrão Alamar Blue.

8. Agente de ligação direcionado, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado tem uma EC_{50} de não mais que 0,04 $\mu\text{g/ml}$ para indução de apoptose das células de Ramos em um ensaio de viabilidade padrão Alamar Blue.

9. Agente de ligação direcionado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado induz a apoptose em células que expressam CD20, induz citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em células que expressam CD20, ou induz citotoxicidade dependente de complemento (CDC) em células que expressam CD20.

10. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado se liga a CD20 com uma K_d de menos que 12 nanomolar (nM).

11. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado se liga a CD20 com uma K_d de menos que 10 nanomolar (nM).

12. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado se

liga a CD20 com uma Kd de menos que 9 nanomolar (nM).

13. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado se
5 liga a CD20 com uma Kd de menos que 5 nanomolar (nM).

14. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado se
liga a CD20 com uma Kd de menos que 4 nanomolar (nM).

10 15. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado é anticorpo monoclonal 1.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7329).

15 16. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado é anticorpo monoclonal 1.5.3 (ATCC Número de acesso PTA-7330).

20 17. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado é anticorpo monoclonal 2.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7328).

25 18. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado compreende um polipeptídeo de cadeia pesada que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 2.

30 19. Agente de ligação direcionado, de acordo com a

reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado compreende um polipeptídeo de cadeia leve que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 4.

20. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das
5 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado compreende um polipeptídeo de cadeia pesada que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 30.

21. Agente de ligação direcionado, de acordo com a
10 reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado compreende um polipeptídeo de cadeia leve que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 32.

22. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das
15 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado compreende um polipeptídeo de cadeia pesada que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 46.

23. Agente de ligação direcionado, de acordo com a
20 reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação direcionado compreende um polipeptídeo de cadeia leve que tem a seqüência de Id. de Seq. N°: 48.

24. Agente de ligação, de acordo com qualquer uma das
reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado por
25 estar em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

25. Molécula de ácido nucléico caracterizada por codificar o agente de ligação direcionado das reivindicações 1 a 8.

26. Vetor caracterizado por compreender a molécula de
30 ácido nucléico da reivindicação 25.

27. Célula hospedeira caracterizada por compreender o vetor da reivindicação 26.

28. Método de tratamento de um linfoma de células B em um animal, caracterizado por compreender a administração
5 ao referido animal em necessidade deste de uma dose terapeuticamente eficaz do agente de ligação direcionado das reivindicações 1 a 8.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o referido linfoma de
10 células B é linfoma não Hodgkin (NHL).

30. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o referido animal é humano.

31. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação
15 direcionado é mAb 1.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7329) ou mAb 1.5.3 (ATCC Número de acesso PTA-7330) ou mAb 2.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7328).

32. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por também compreender a administração de um
20 segundo agente selecionado do grupo que consiste em um anticorpo, um medicamento quimioterápico e um medicamento radioativo.

33. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a referida administração
25 está em conjunto com ou após uma cirurgia convencional, um transplante de células tronco de medula óssea ou um transplante de células-tronco periféricas.

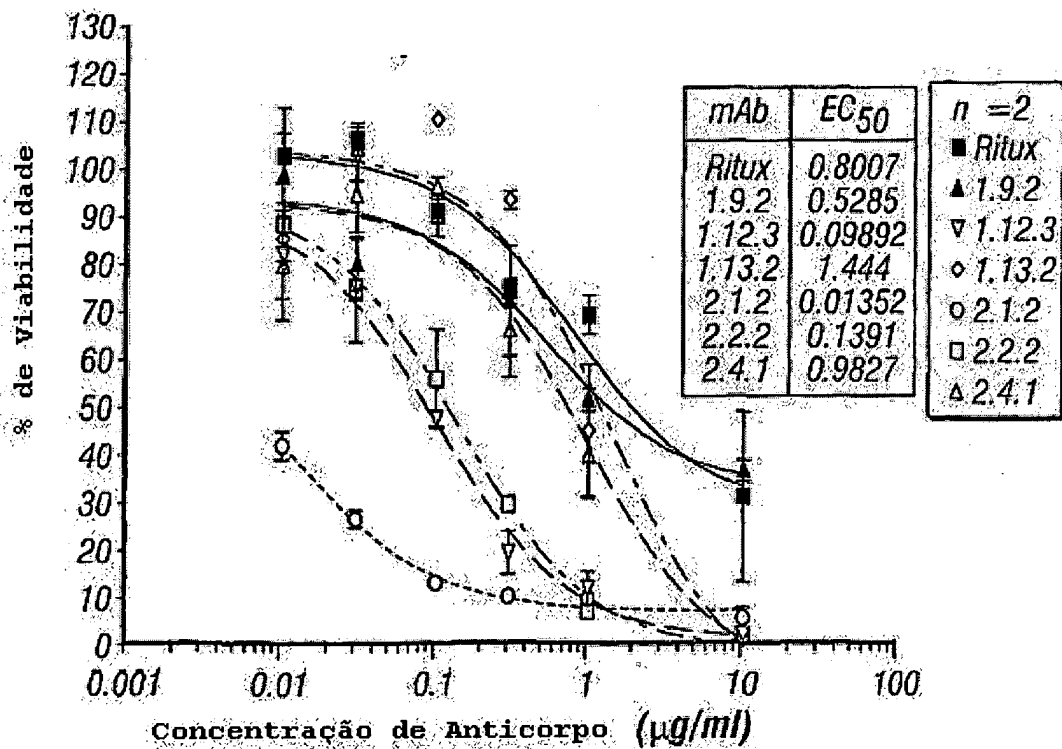
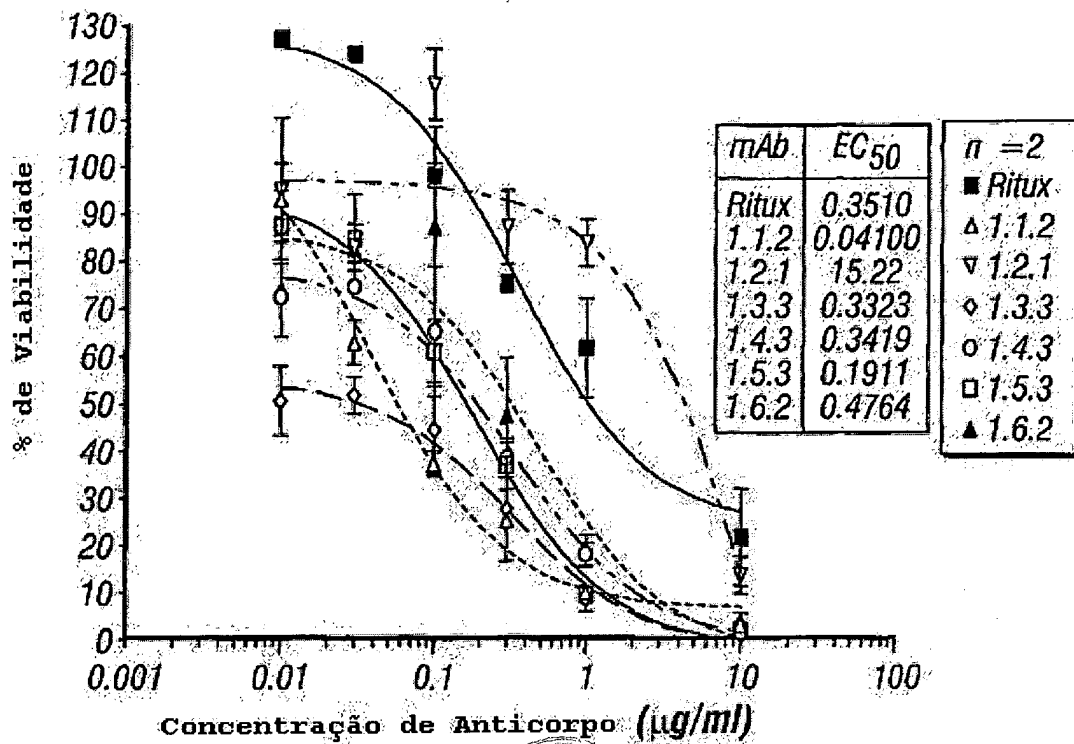
34. Uso do agente de ligação direcionado das reivindicações 1 a 8 caracterizado para a preparação de um
30 medicamento para o tratamento de um linfoma de células B.

35. Uso, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o referido linfoma de células B é linfoma não Hodgkin (NHL).

5 36. Uso, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o referido agente de ligação direcionado é mAb 1.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7329) ou mAb 1.5.3 (ATCC Número de acesso PTA-7330) ou mAb 2.1.2 (ATCC Número de acesso PTA-7328).

10 37. Uso, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o referido medicamento é para uso em combinação com um segundo agente anti-neoplásico selecionado do grupo que consiste em um anticorpo, um agente quimioterápico ou um medicamento radioativo.

15 38. Uso, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o referido medicamento é para uso junto com ou após uma cirurgia convencional, um transplante de células-tronco de medula óssea ou um transplante de células-tronco periféricas.



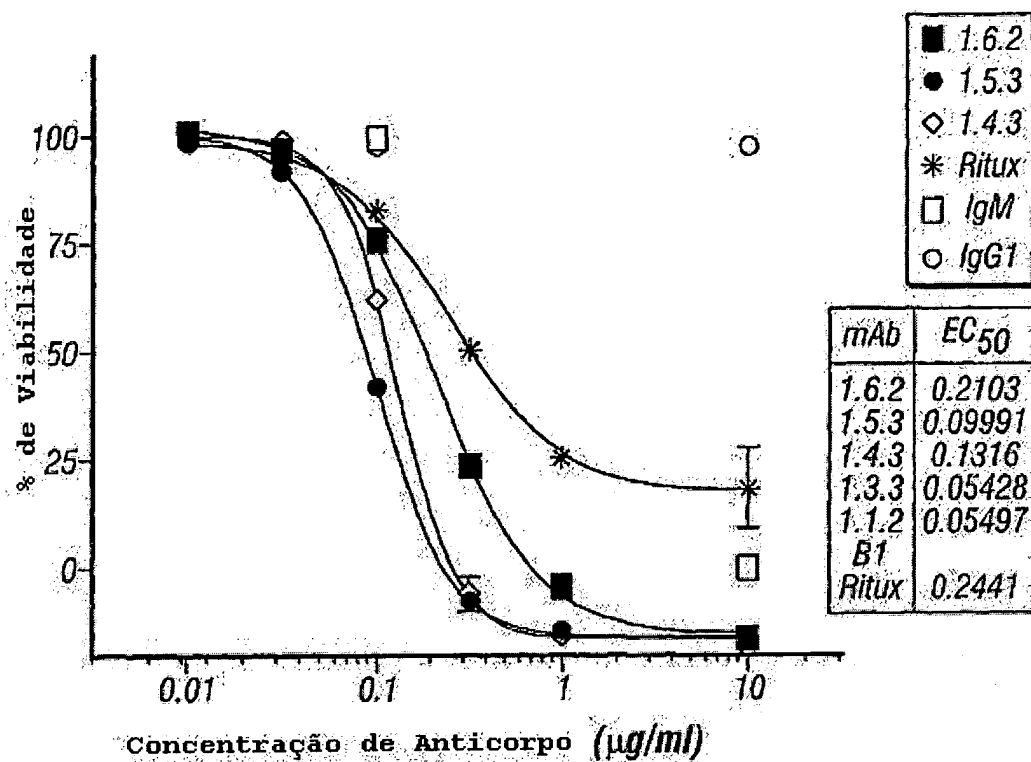


FIG. 3A

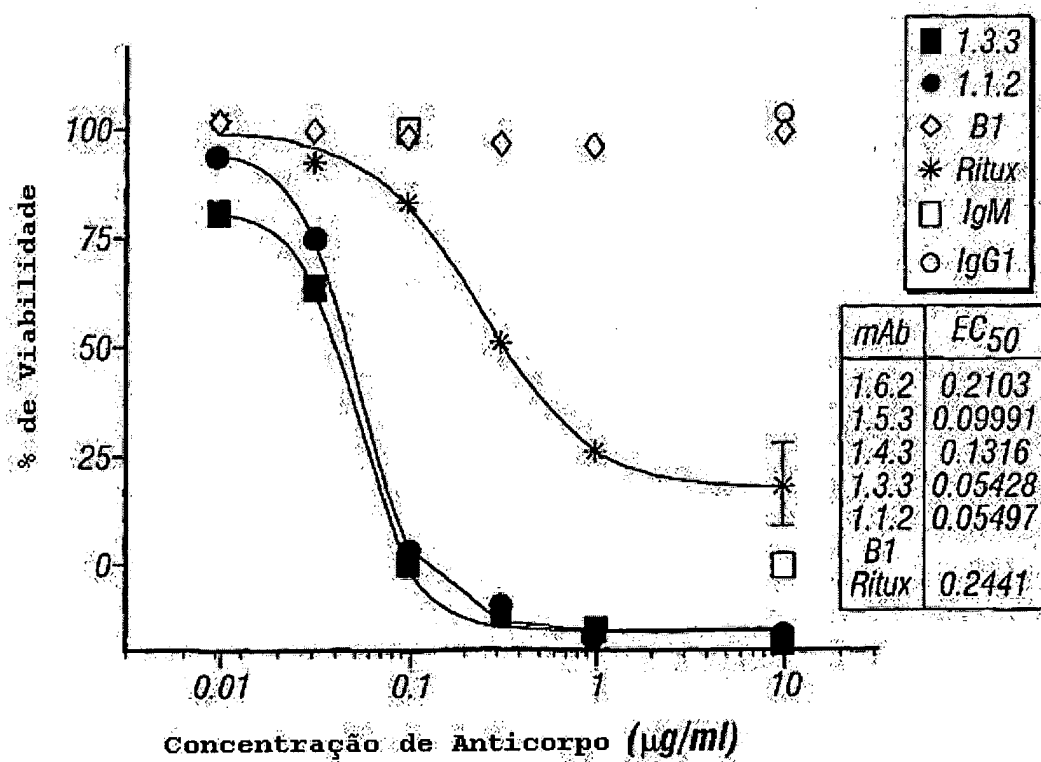


FIG. 3B

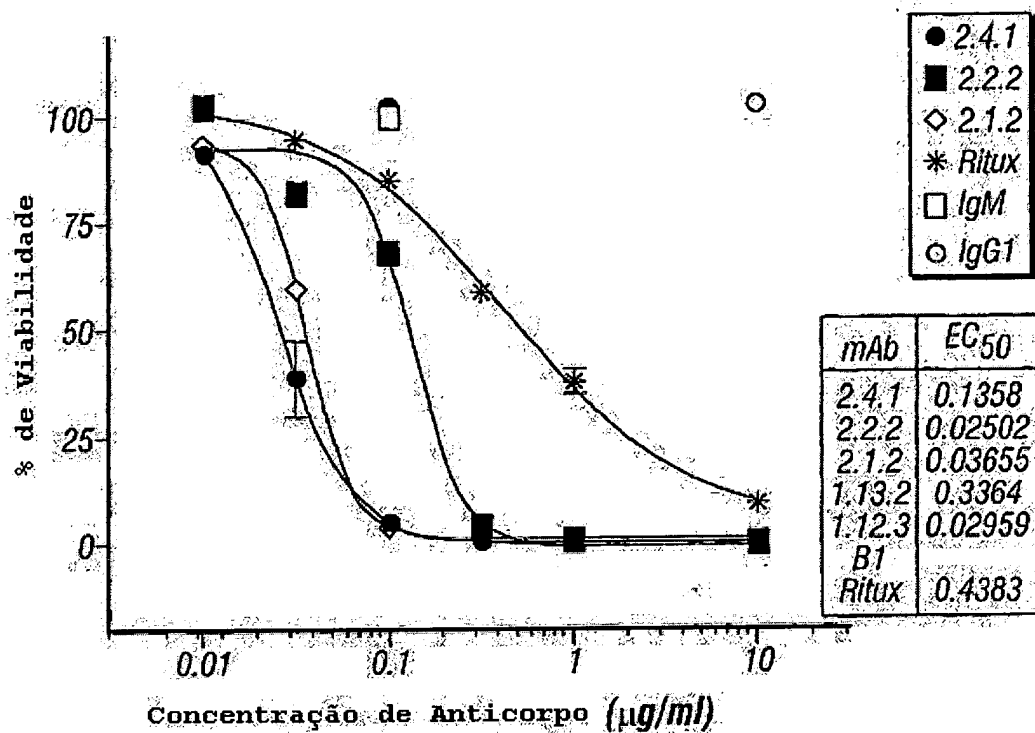


FIG. 3C

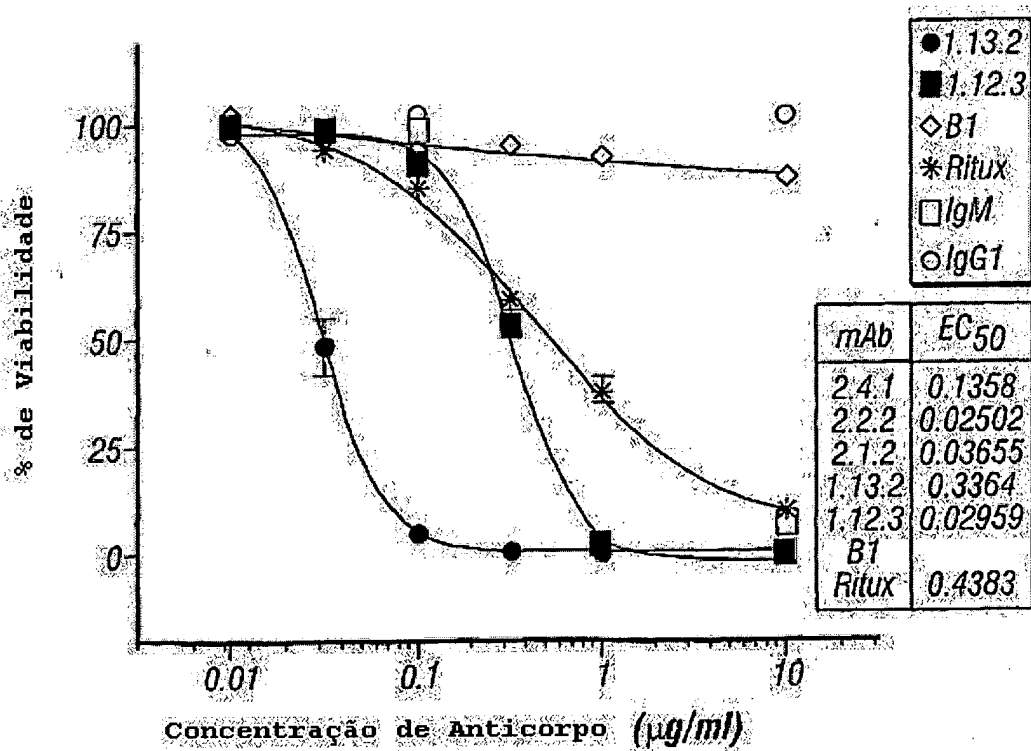
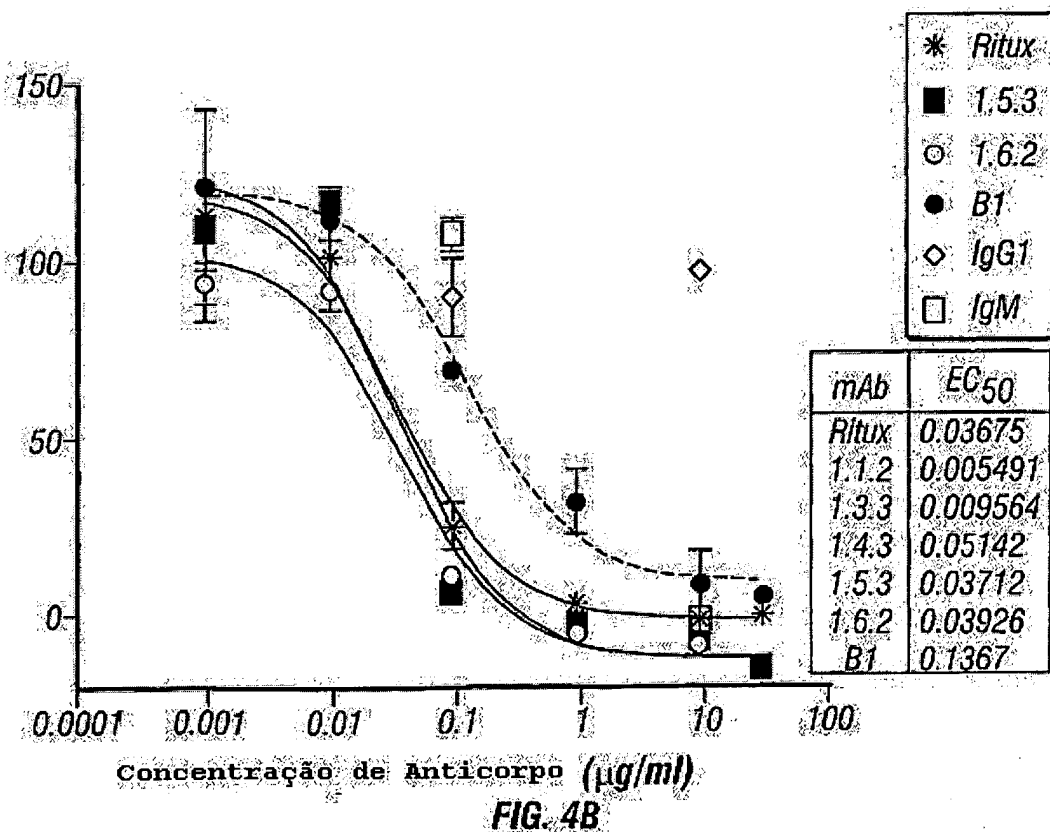
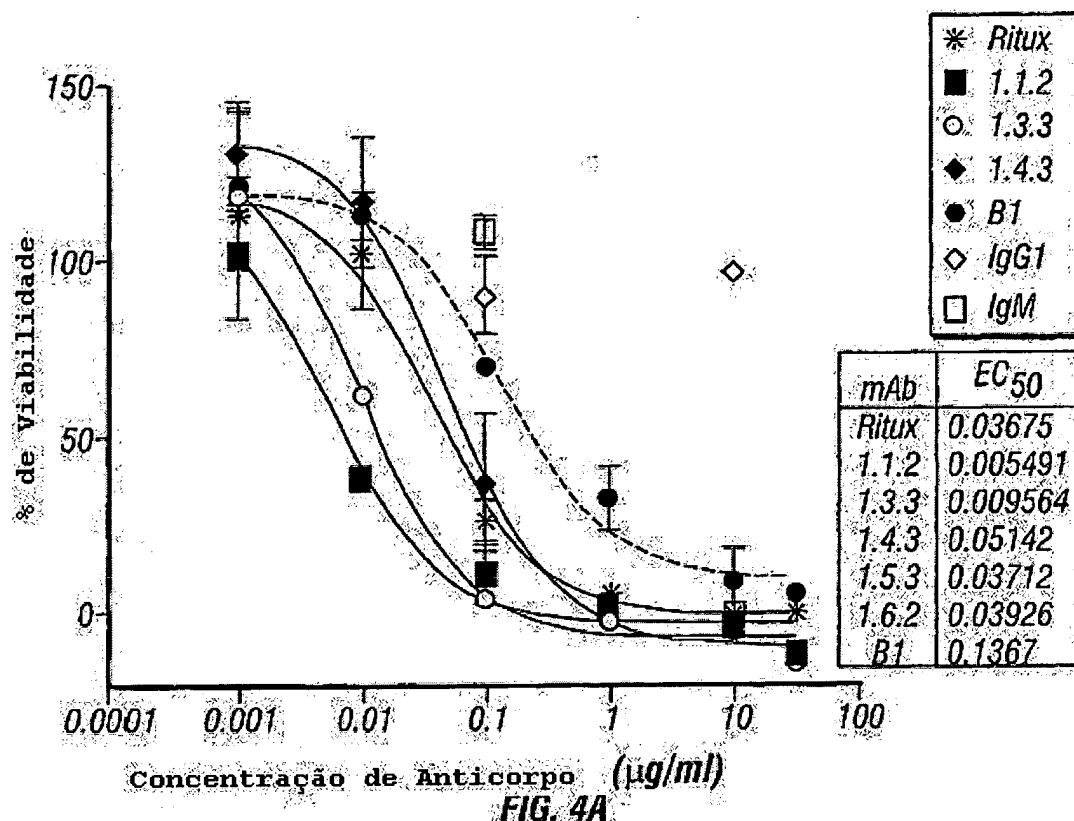
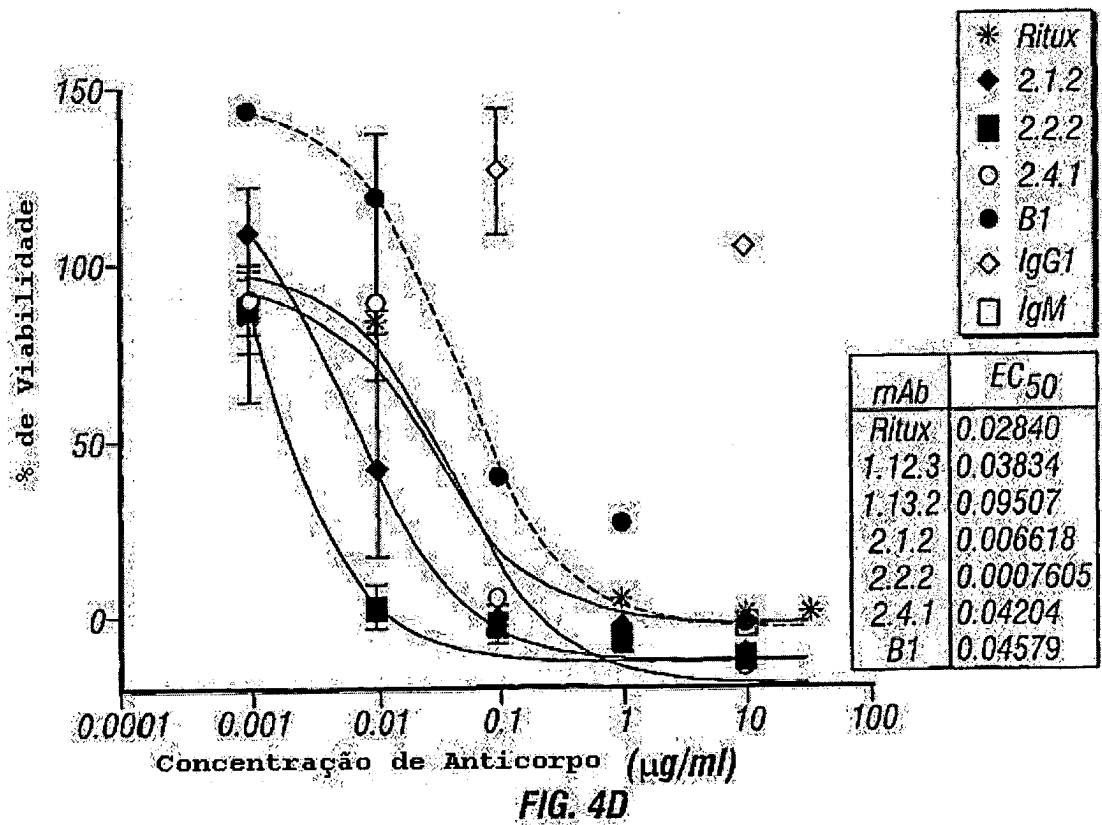
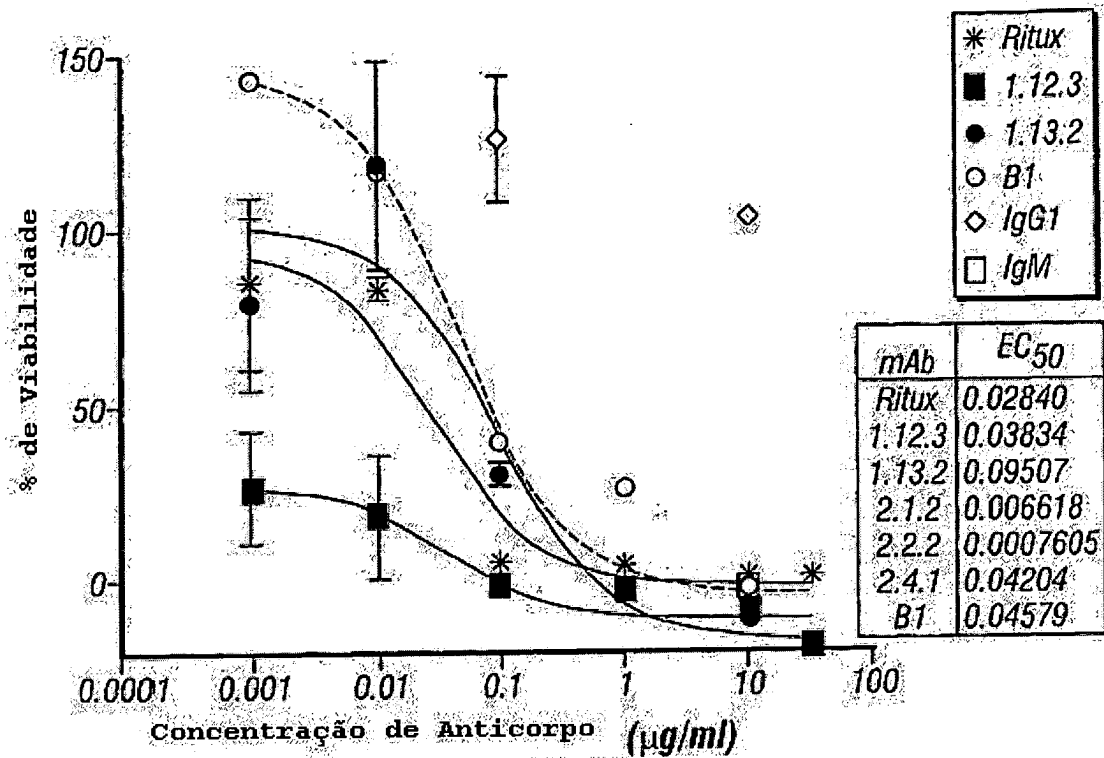


FIG. 3D





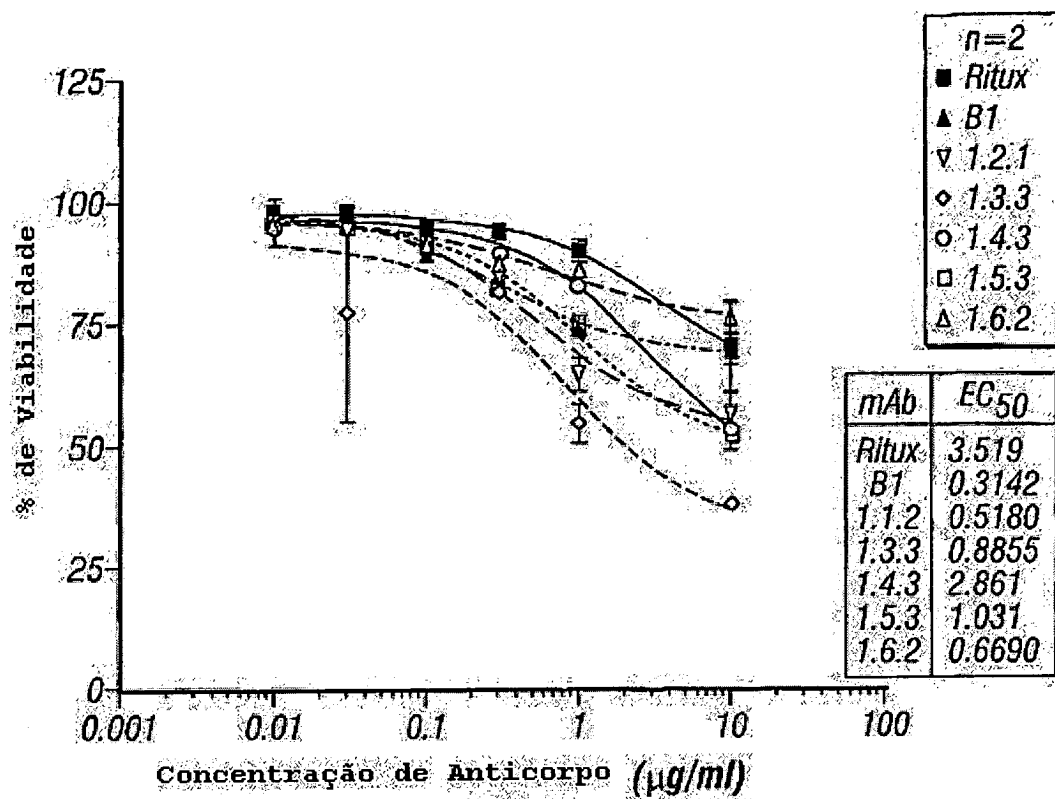


FIG. 5

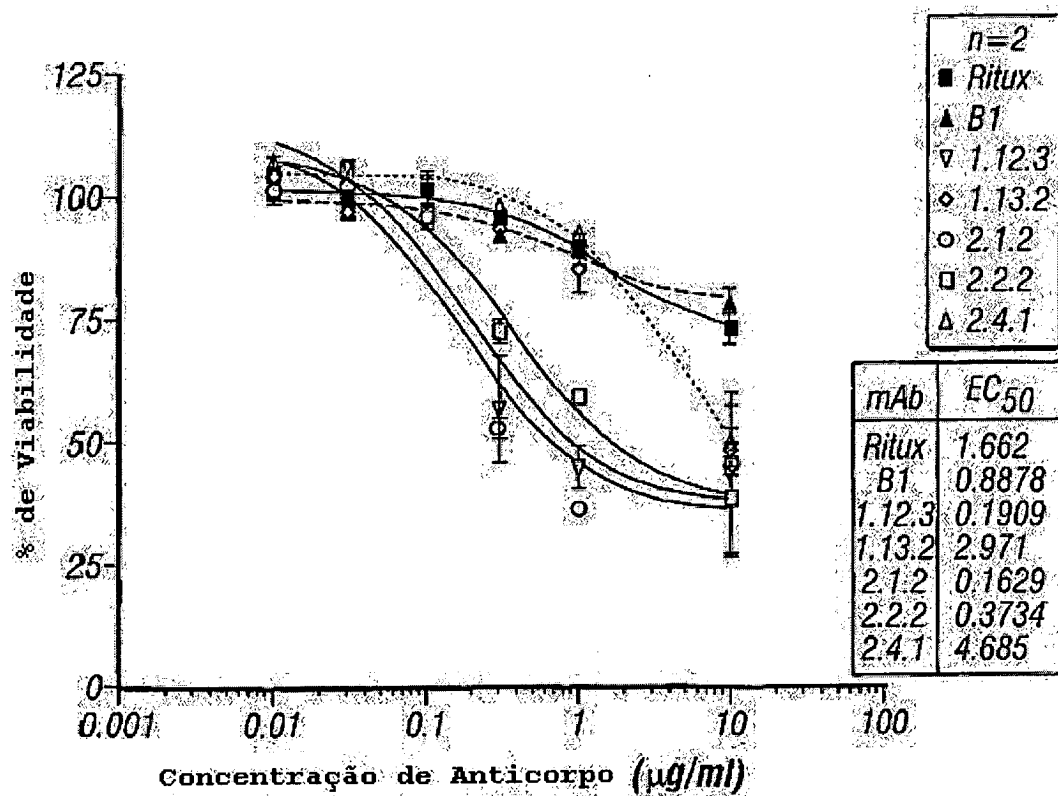


FIG. 6

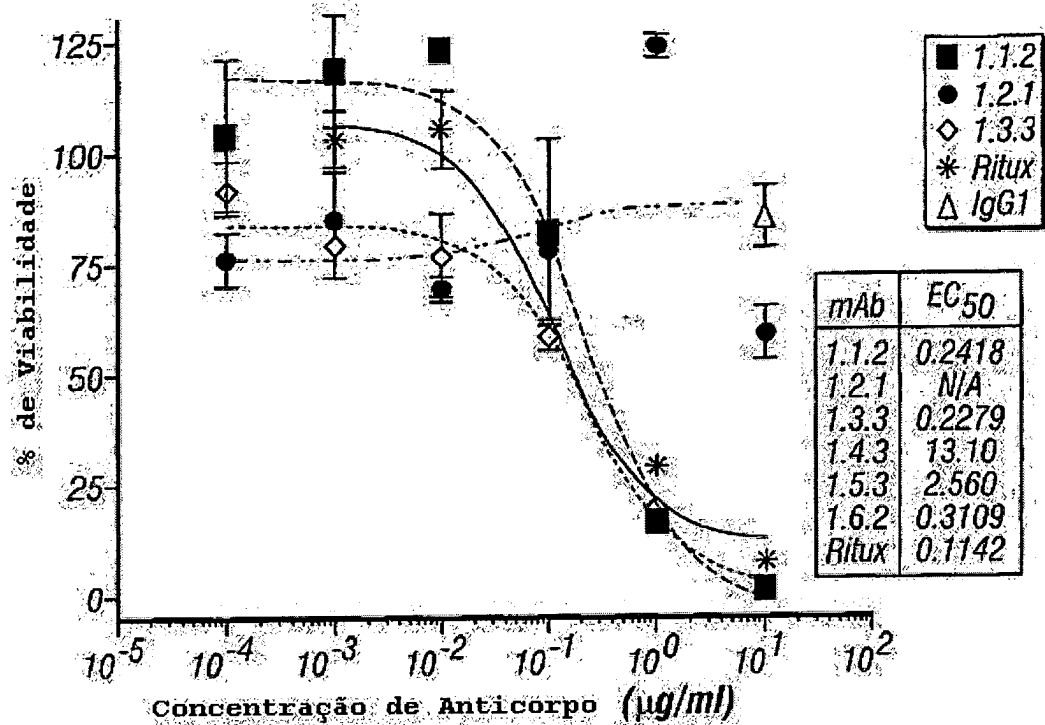


FIG. 7A

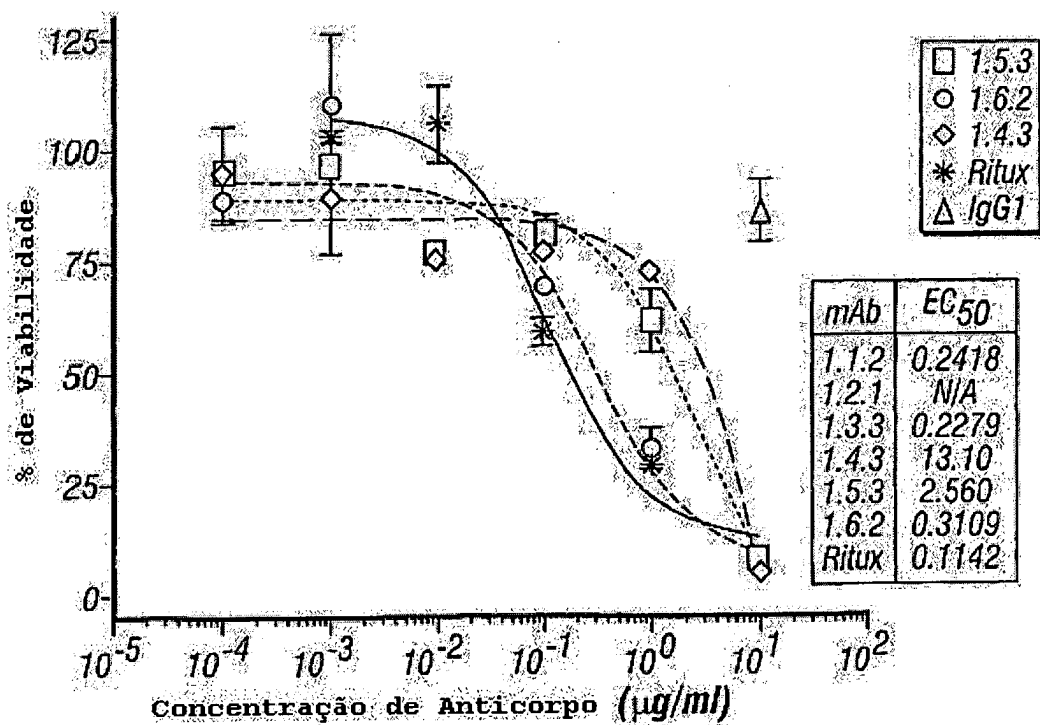


FIG. 7B

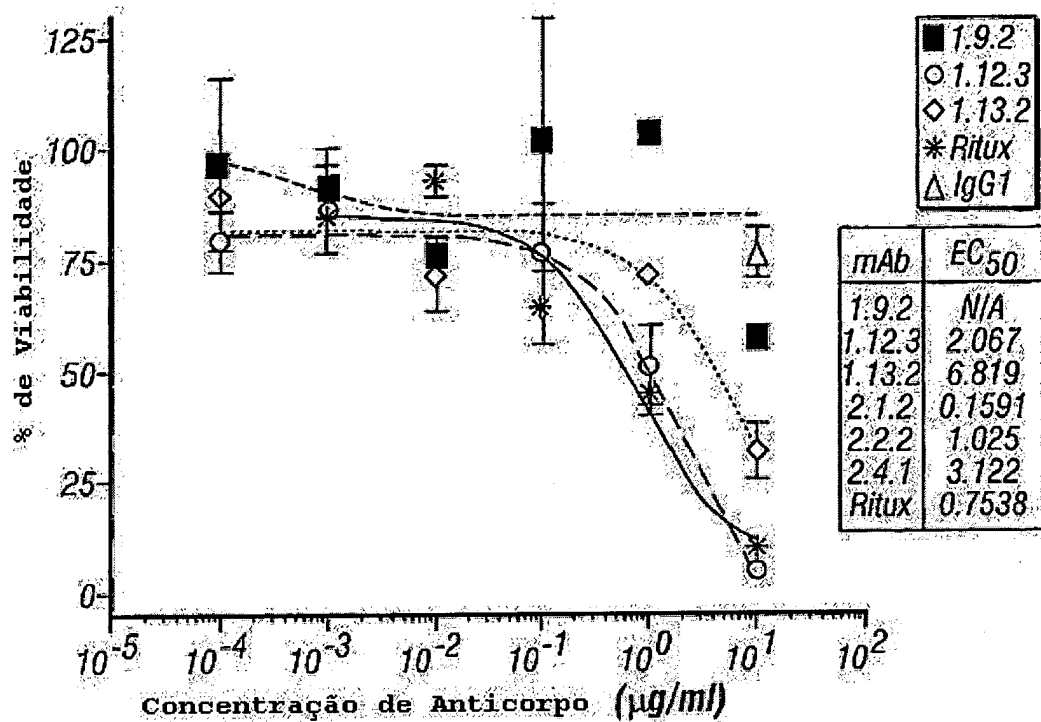


FIG. 7C

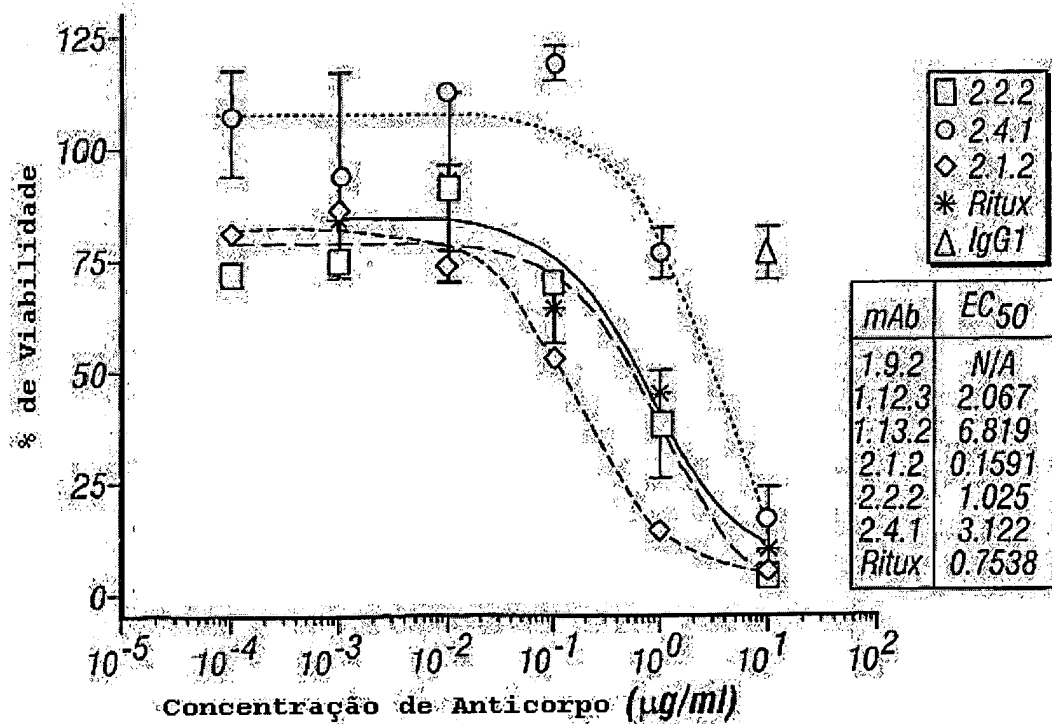


FIG. 7D

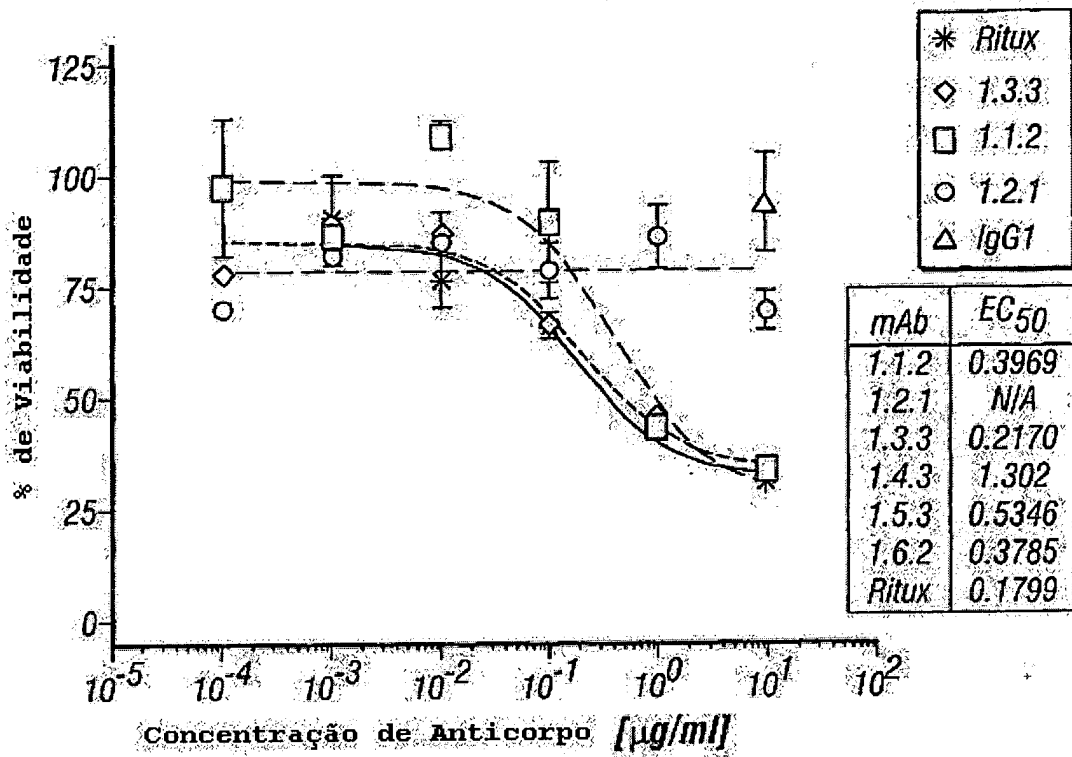


FIG. 8A

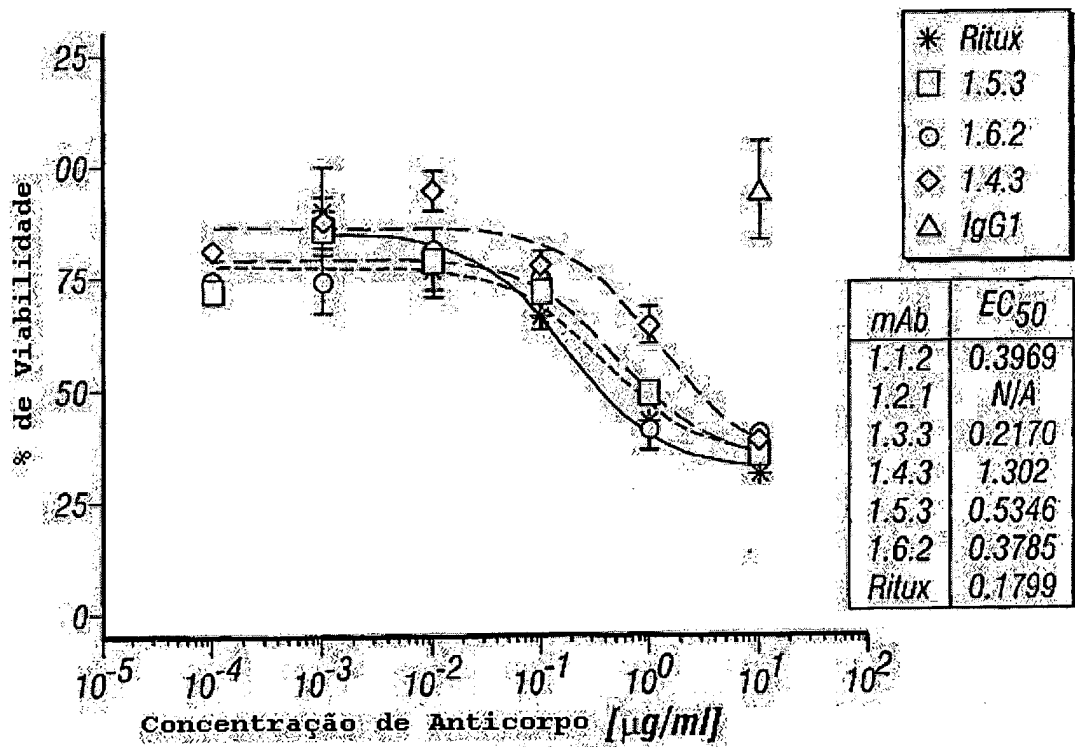


FIG. 8B

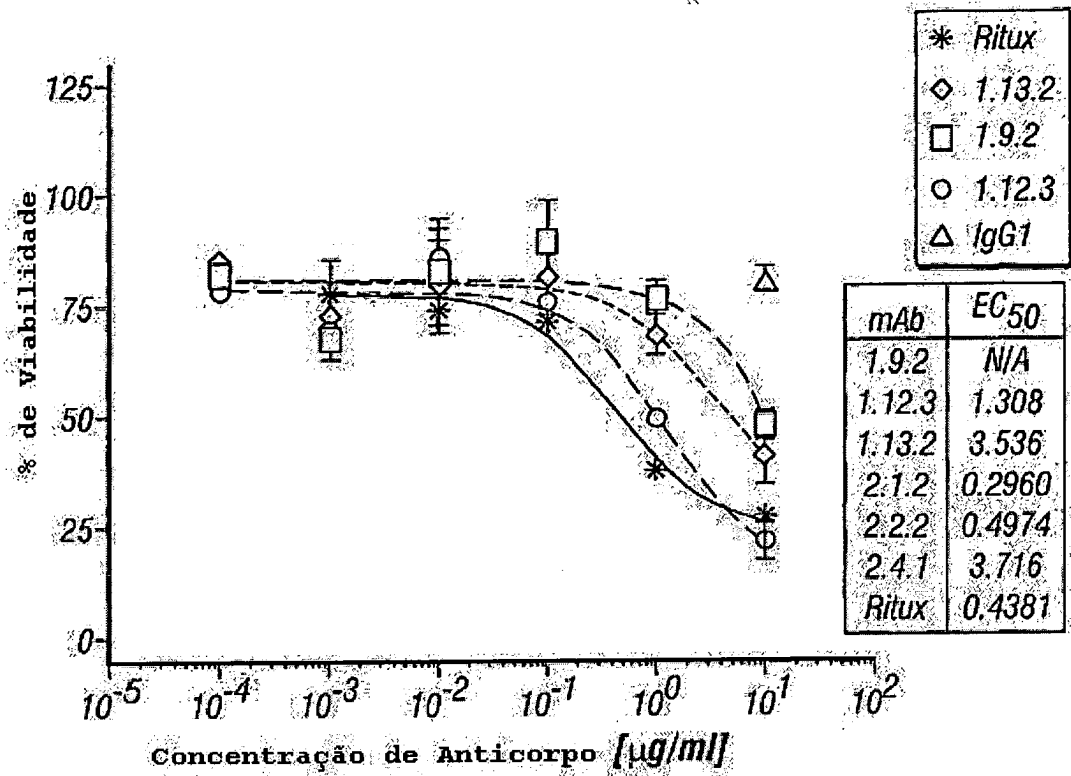


FIG. 8C

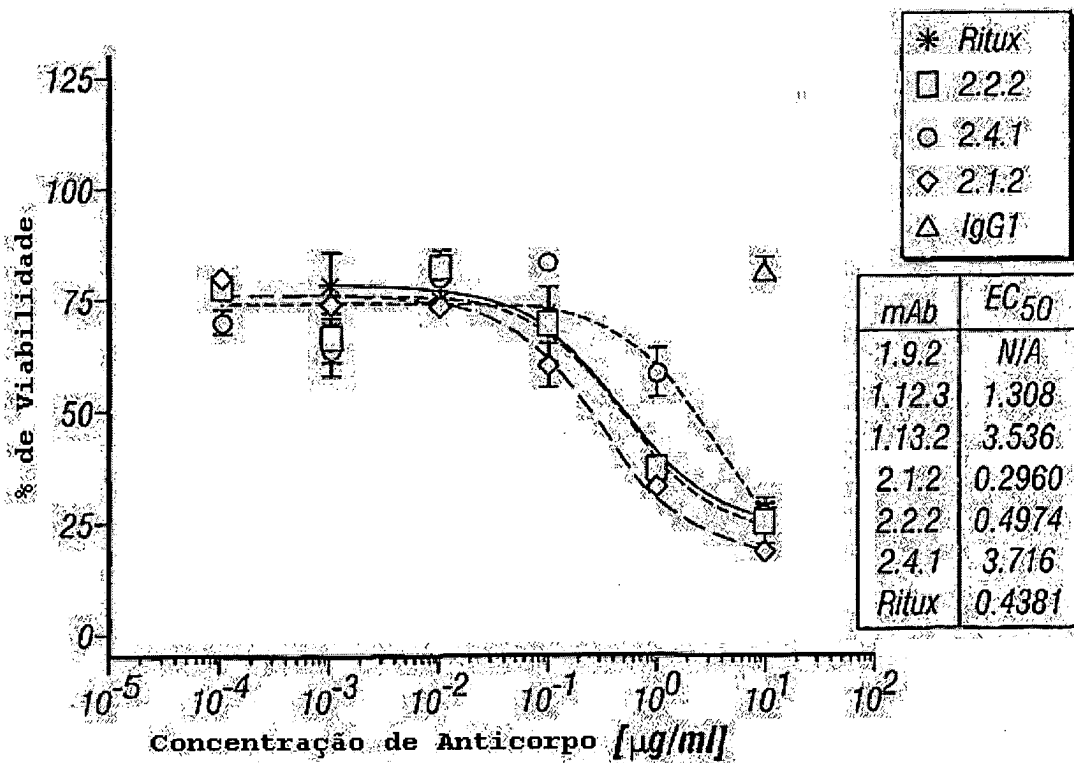


FIG. 8D

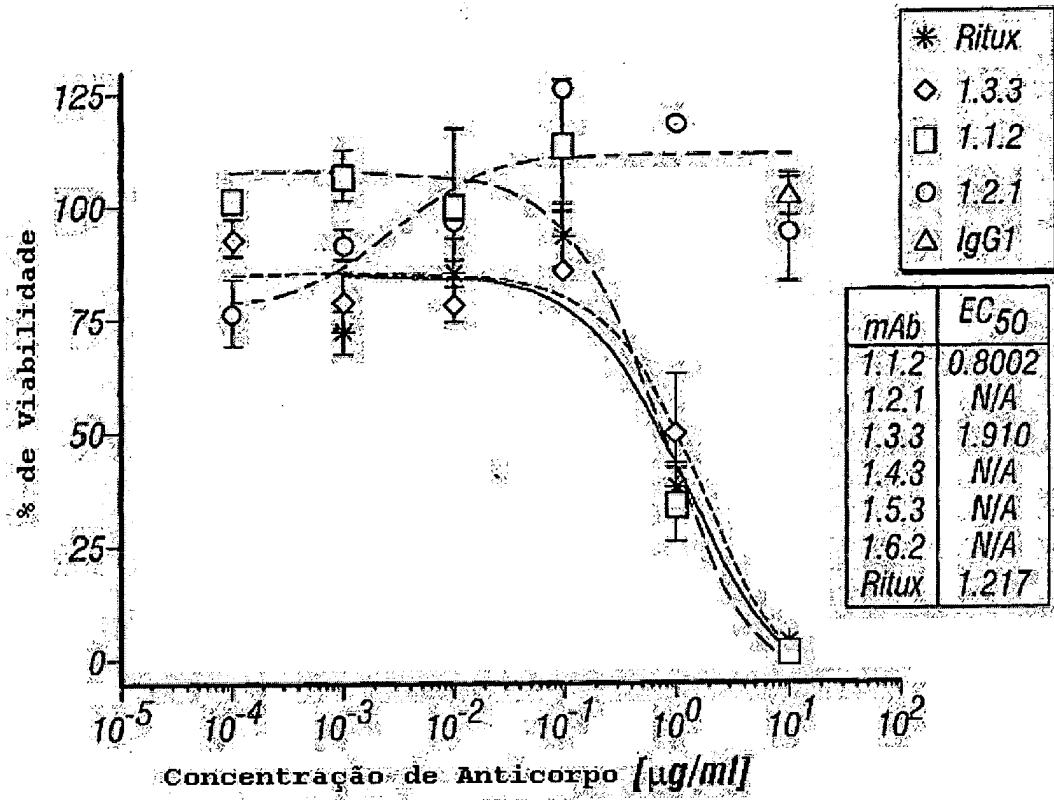


FIG. 9A

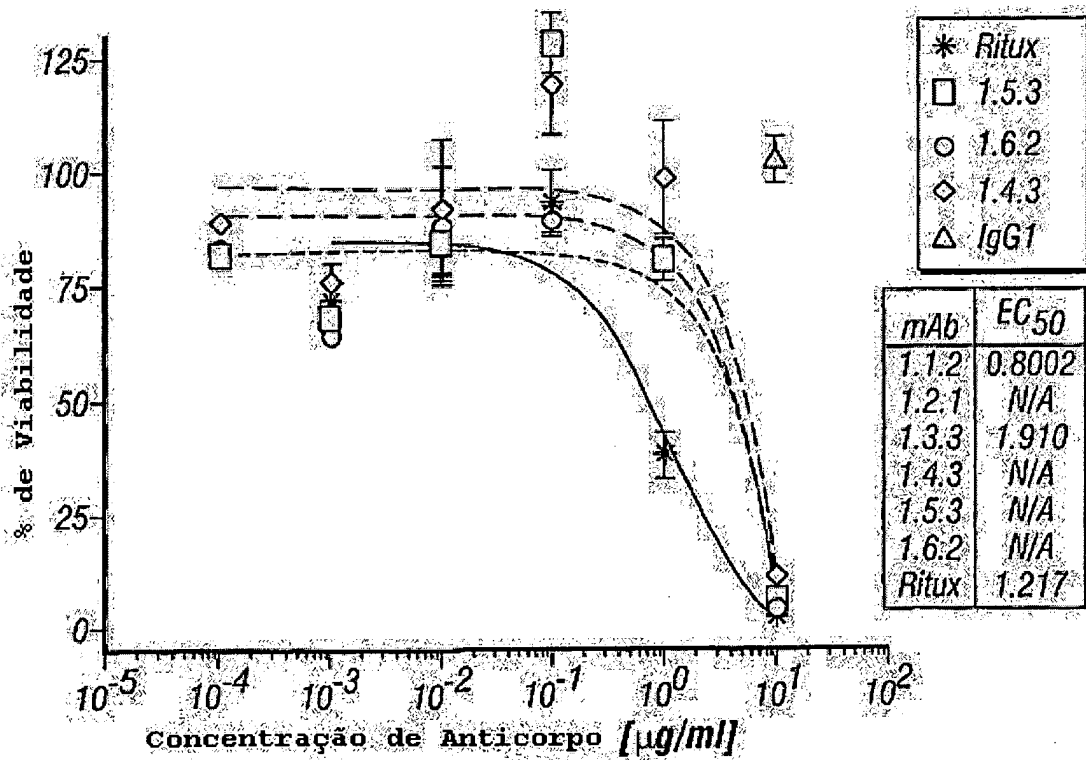


FIG. 9B

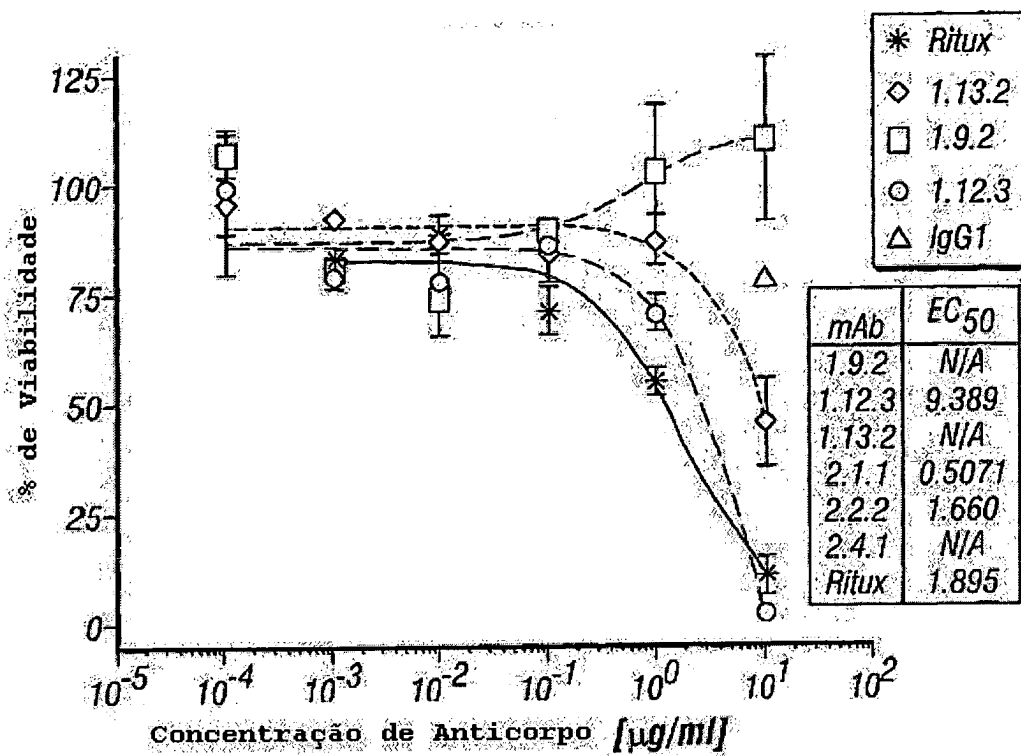


FIG. 9C

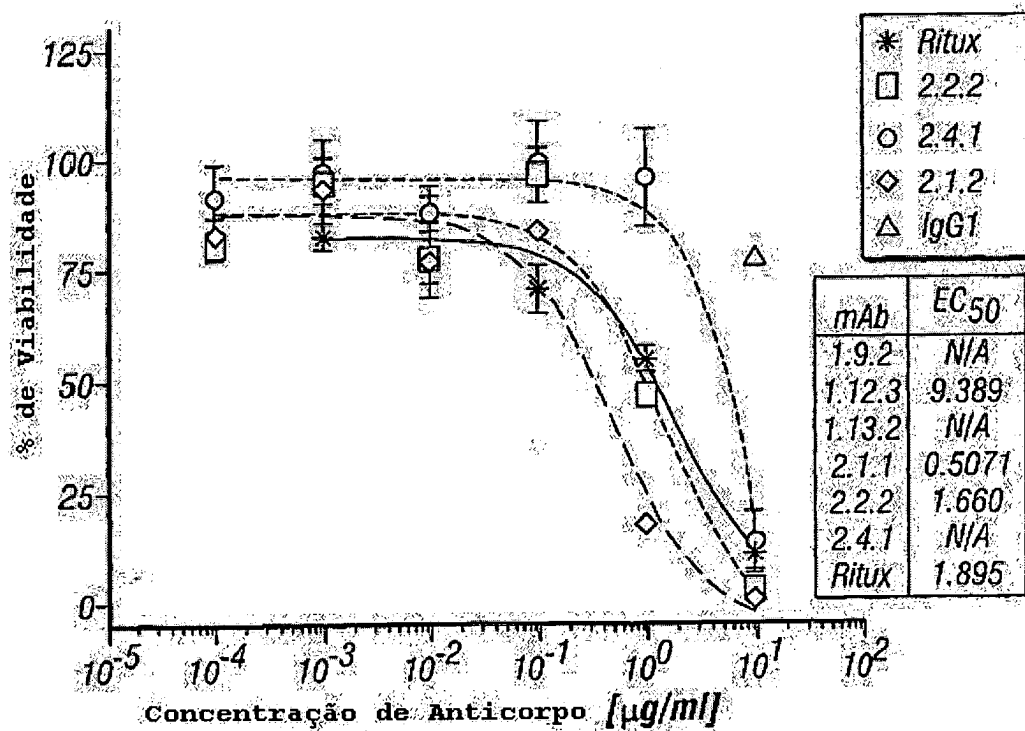


FIG. 9D

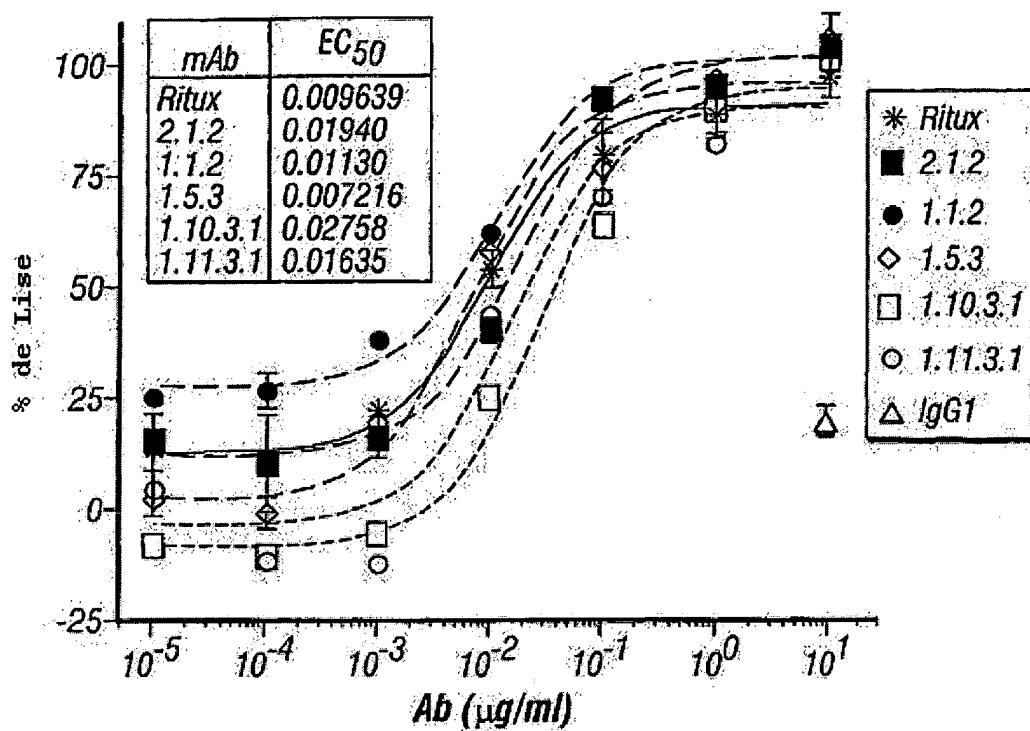


FIG. 10

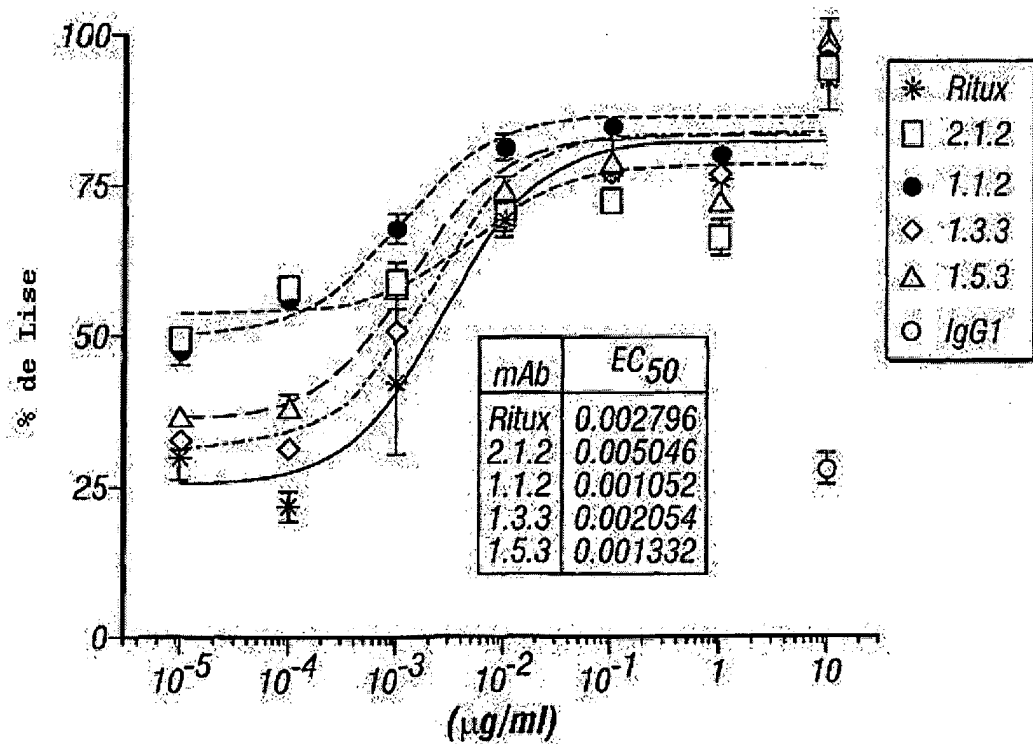


FIG. 11

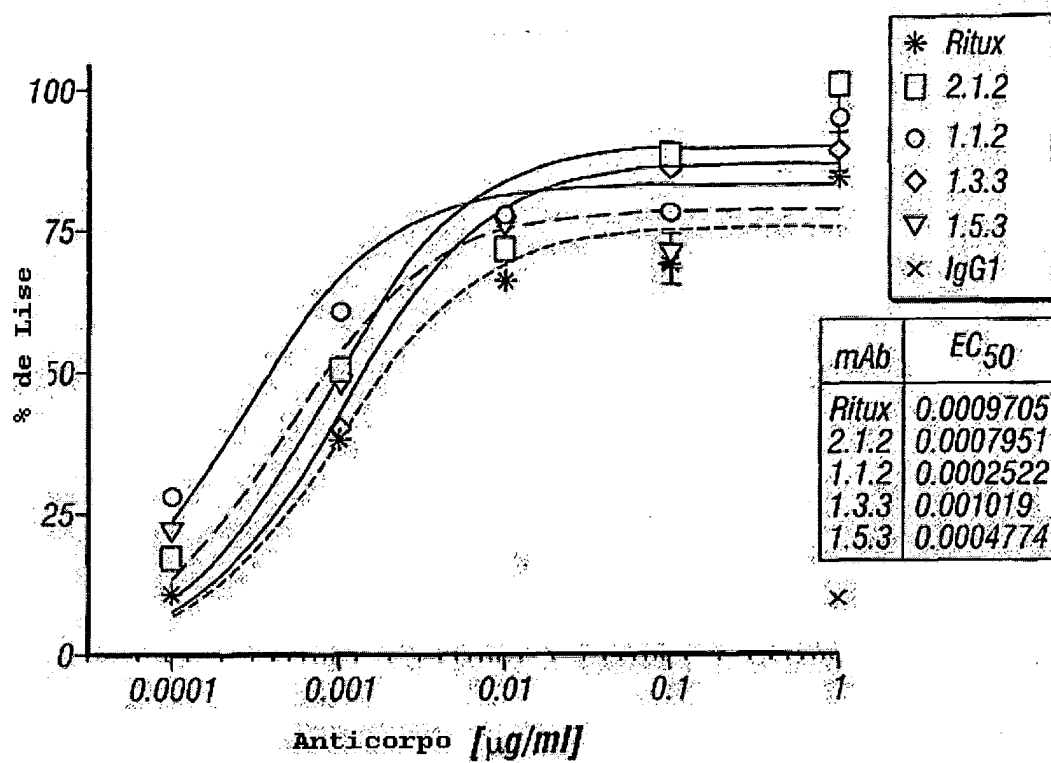


FIG. 12

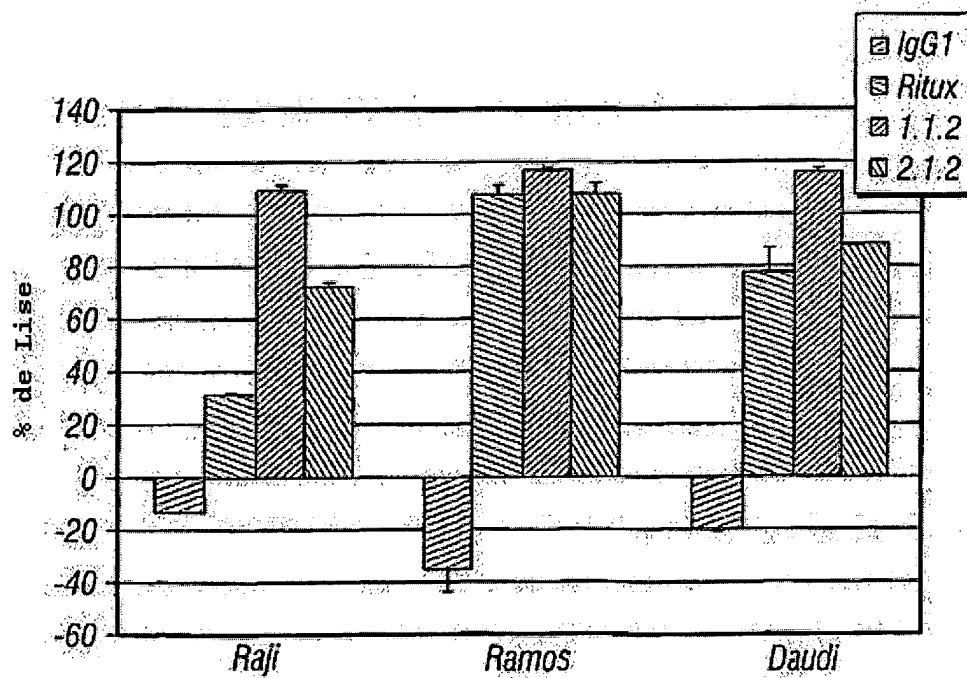


FIG. 13

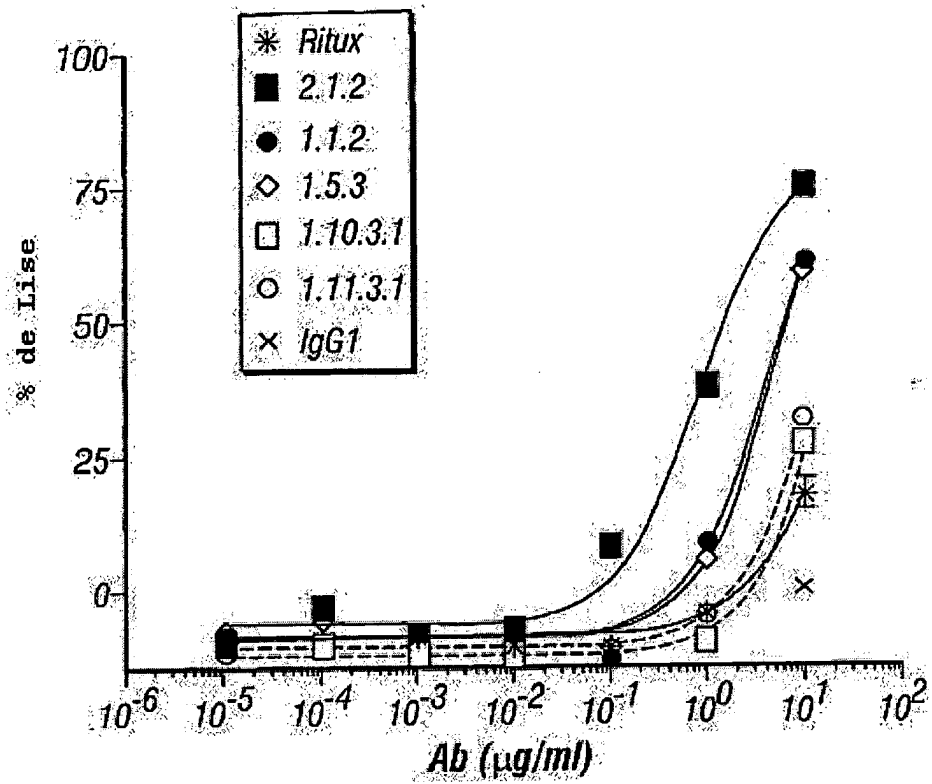


FIG. 14A

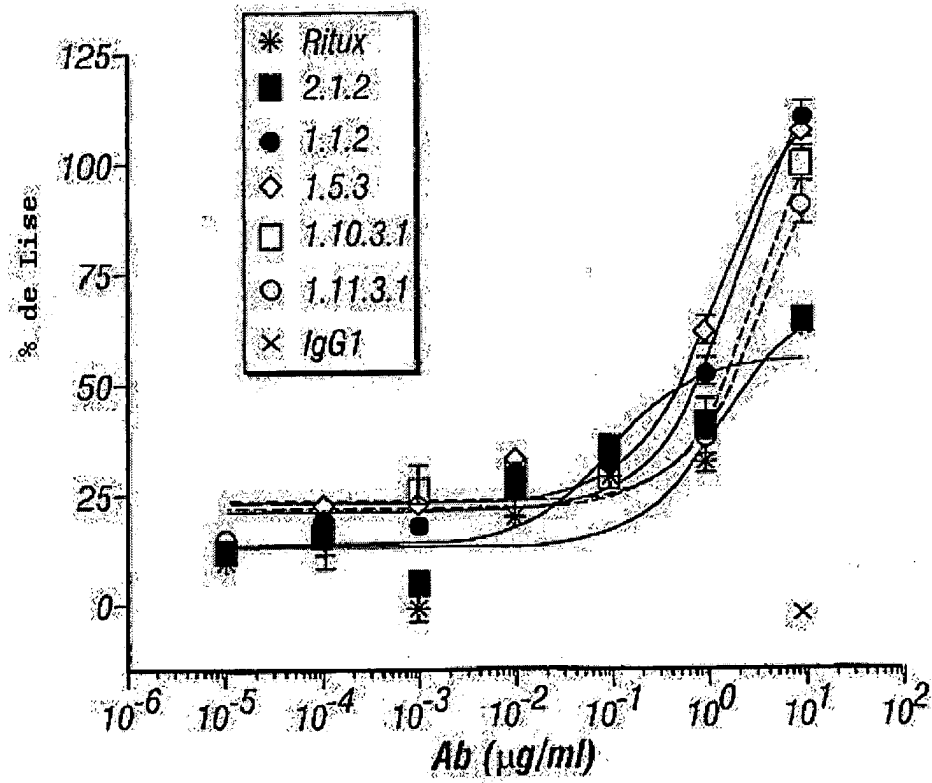


FIG. 14B

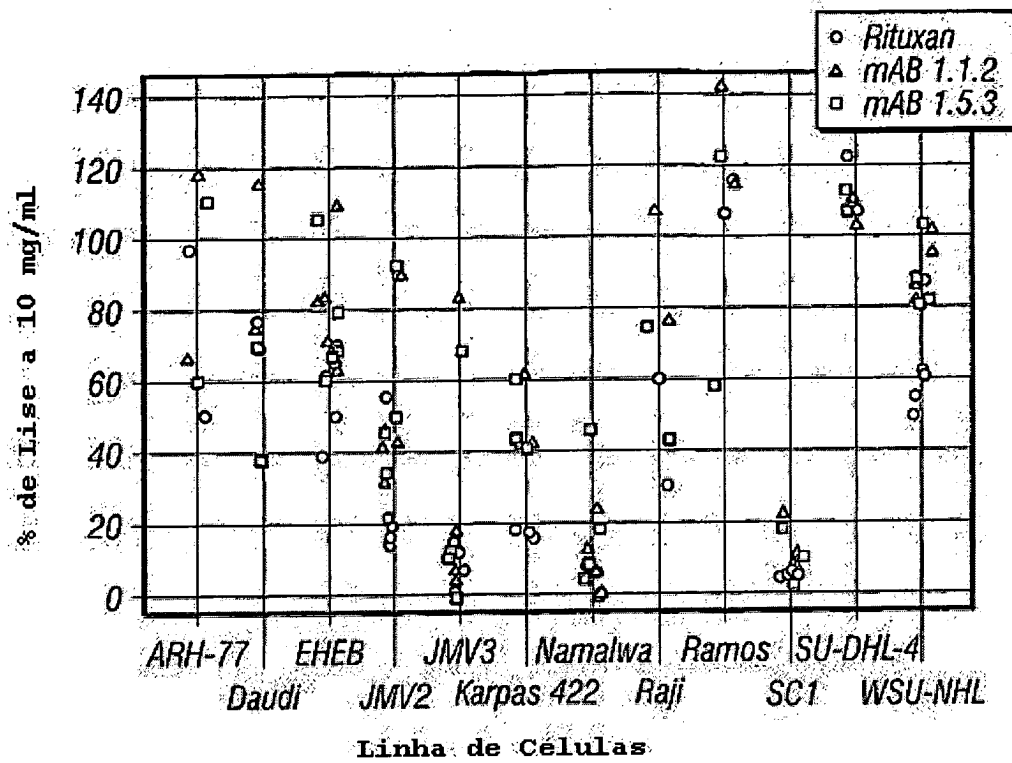


FIG. 15

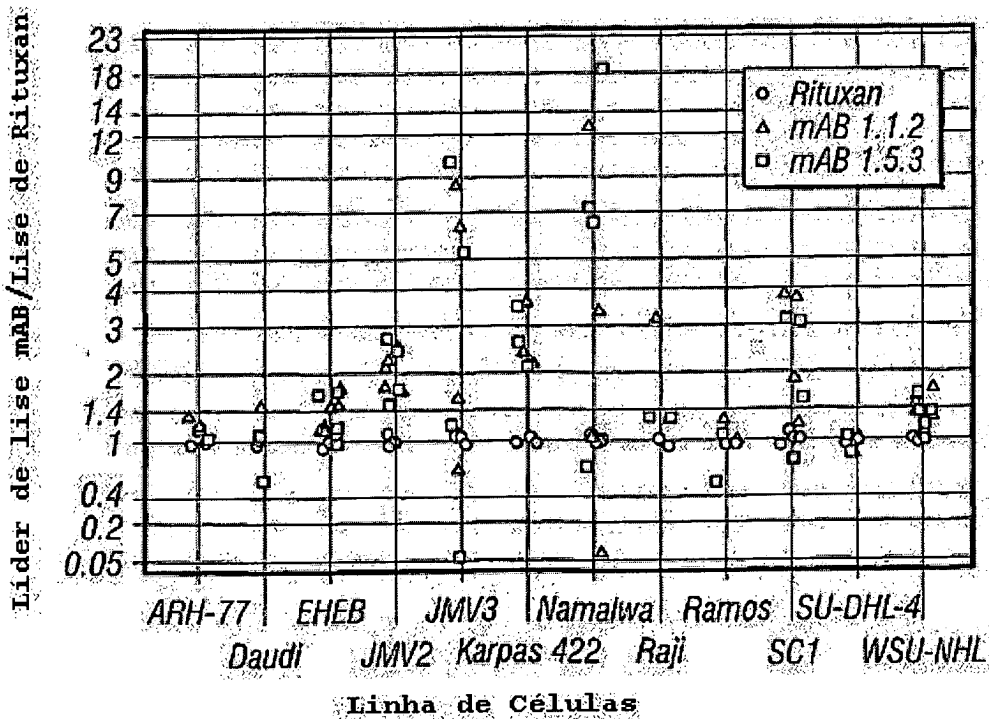


FIG. 16

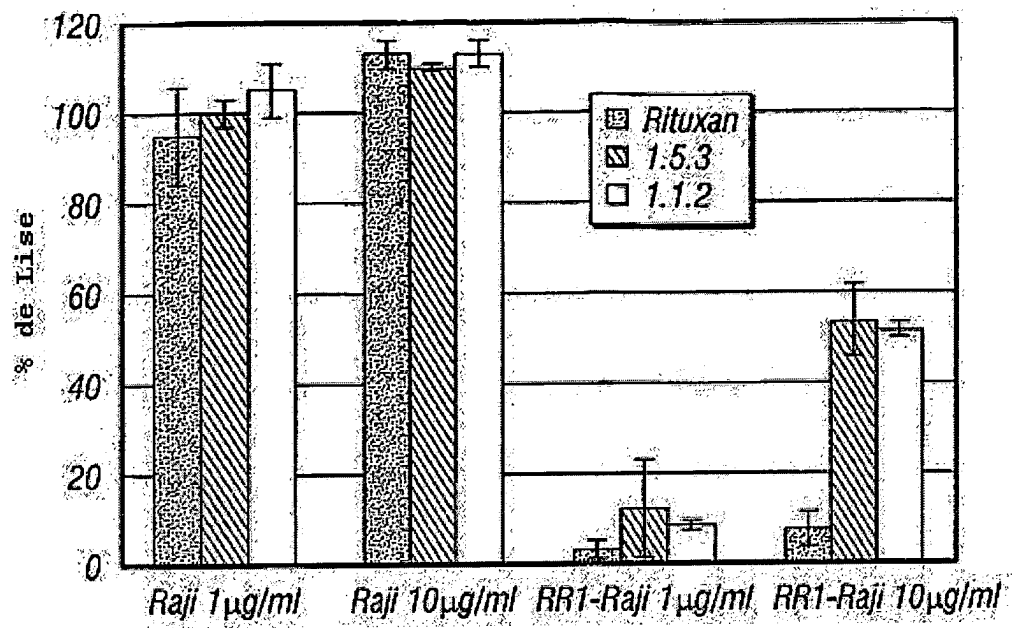


FIG. 17

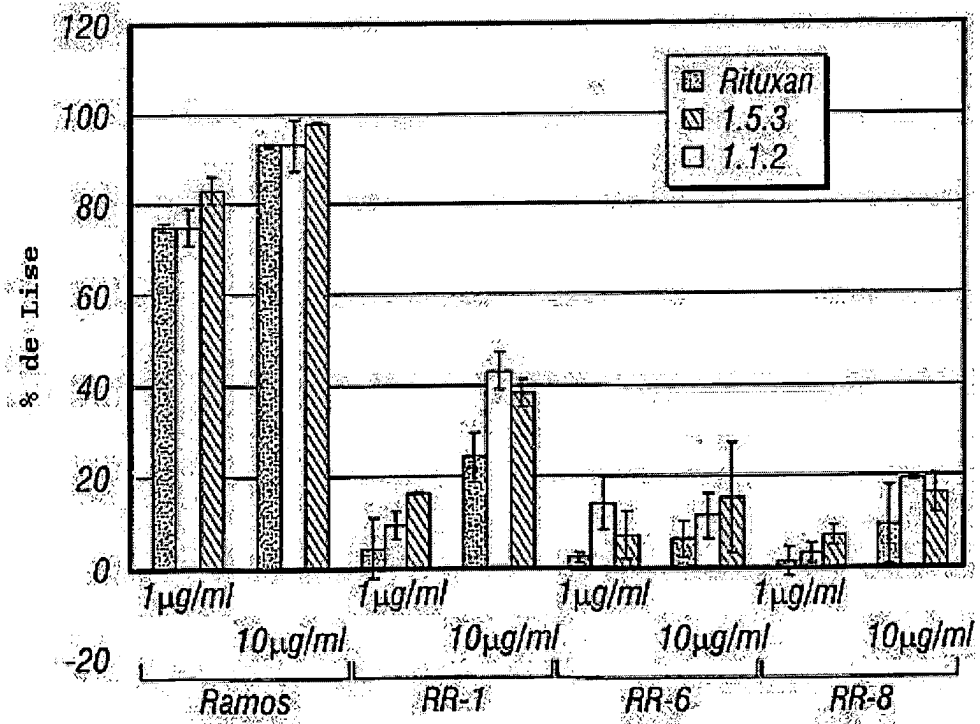


FIG. 18

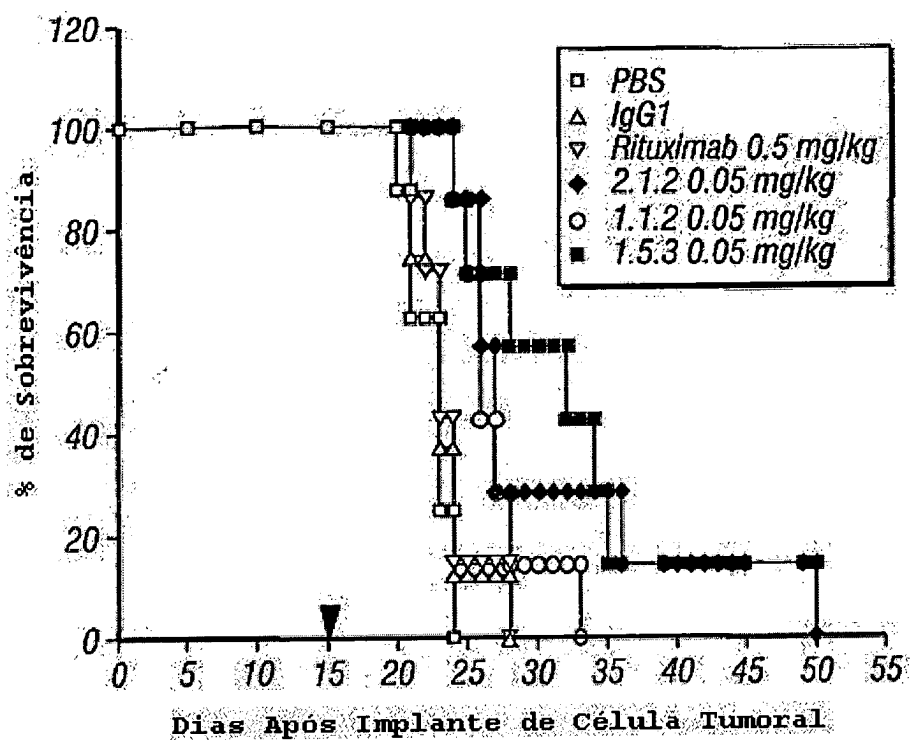


FIG. 19

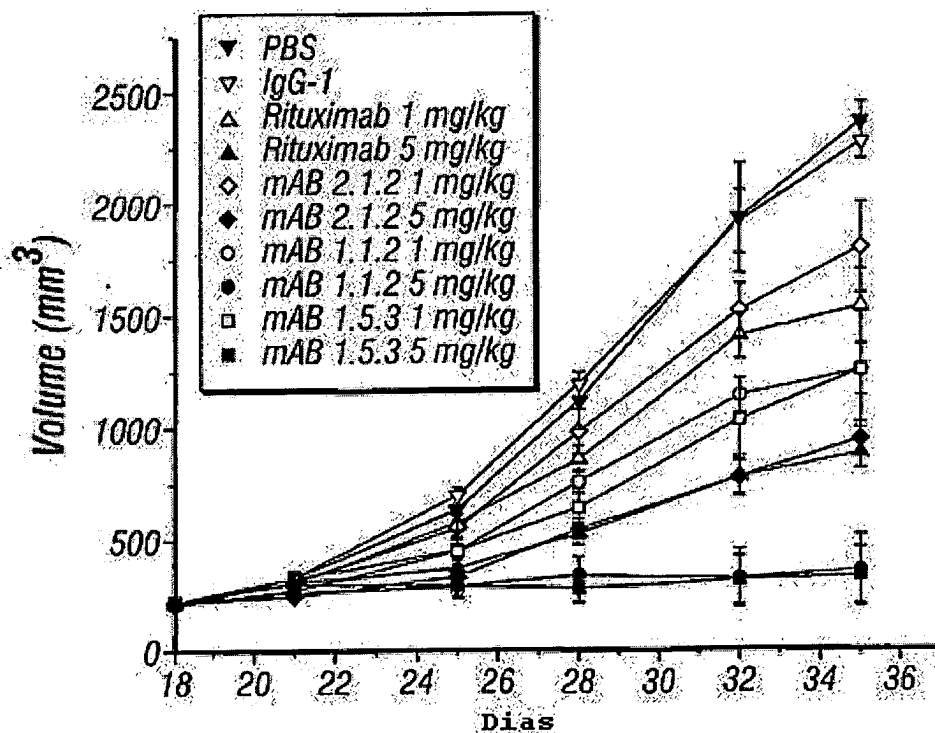


FIG. 20

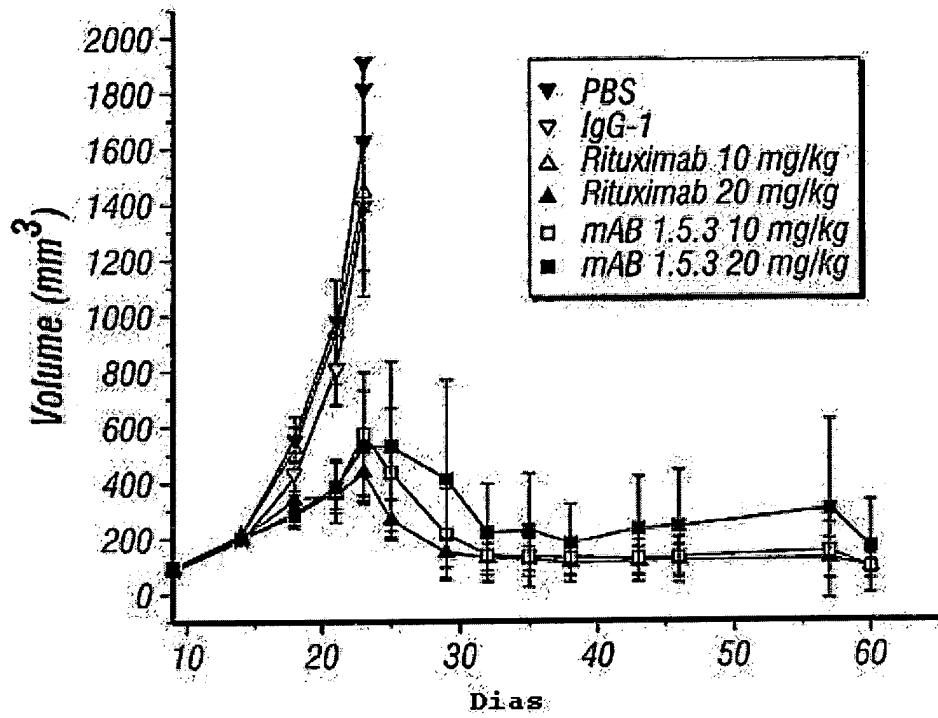


FIG. 21

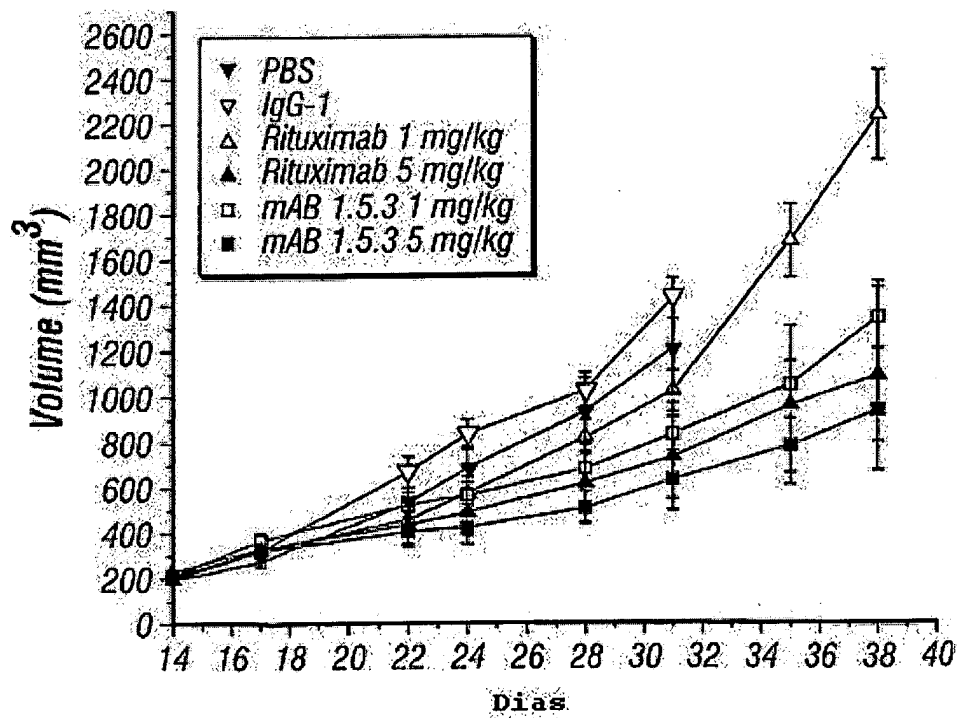


FIG. 22

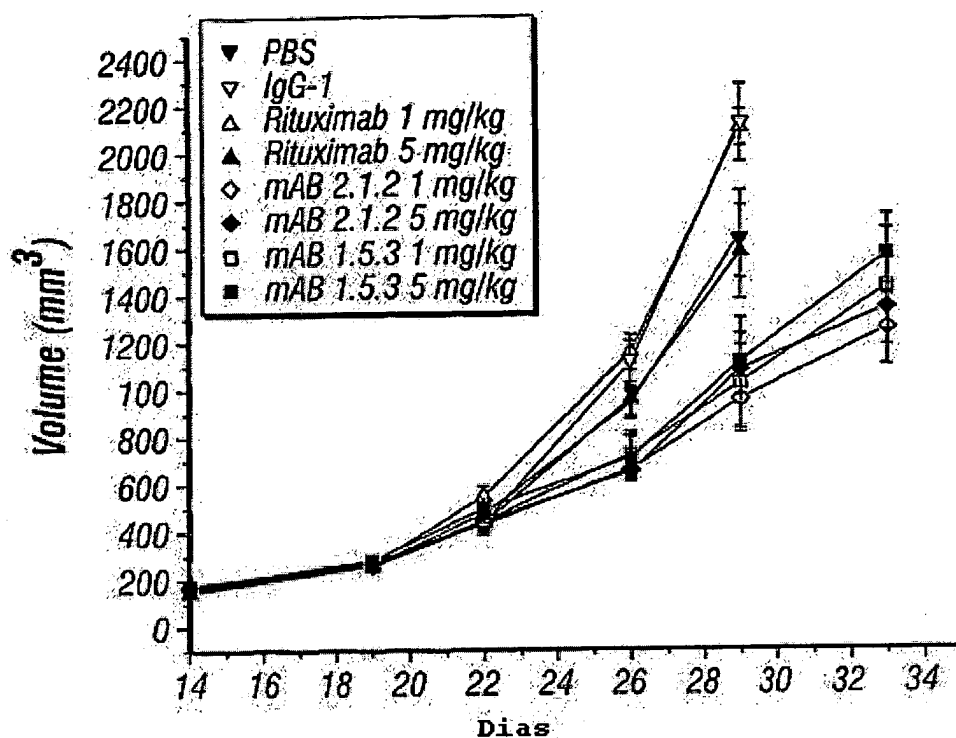


FIG. 23

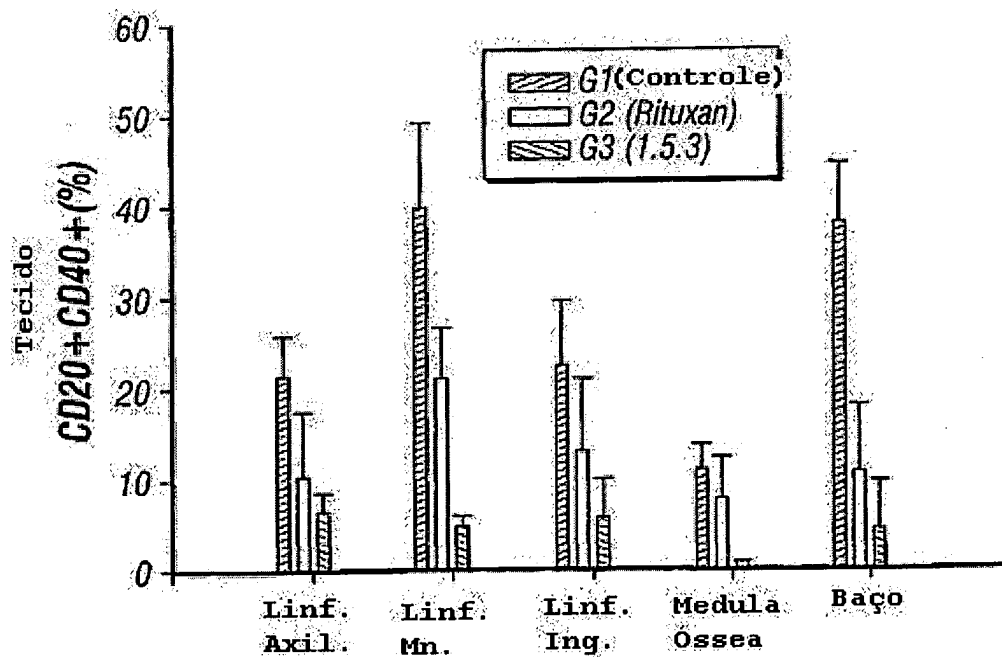


FIG. 24

ANTICORPOS DIRECIONADOS PARA CD20 E USOS DOS MESMOS

São aqui revelados anticorpos direcionados ao antígeno CD20 e usos de tais anticorpos. Em particular, anticorpos monoclonais completamente humanos direcionados ao antígeno CD20. São reveladas seqüências de nucleotídeos que codificam, e seqüências de aminoácidos que compreendem, moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada e leve, particularmente seqüências que correspondem a seqüências de cadeia pesada e leve contíguas que sobrepõem as regiões de estrutura e/ou regiões de determinação de complementaridade (CDR's), especificamente de FR1 a FR4 ou CDR1 a CDR3. Hibridomas ou outras linhas de células que expressam tais moléculas de imunoglobulina e anticorpos monoclonais são também revelados.