



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

(21) PI 0808087-9 A2



* B R P I 0 8 0 8 0 8 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 12/02/2008

(43) Data da Publicação: 30/07/2013
(RPI 2221)

(51) Int.Cl.:

C07K 16/28
A61P 35/00

(54) Título: ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE TRANSFORMADA, TRANSFECTADA OU TRANSDUZIDA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPO OU DE FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT-DE-PARTES, MÉTODO PARA TRATAR PACIENTE HUMANO AFLIGIDO COM CÂNCER, E, USO DE ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO

(30) Prioridade Unionista: 14/02/2007 GB 0702888.9,
01/08/2008 US 60/953210, 01/08/2008 US 60/953210, 14/02/2007 GB
0702888.9

(73) Titular(es): Glaxo Group Limited

(72) Inventor(es): Alan Peter Lewis, Jonathan Henry Ellis,
Michael Neil Burden, Paul Andrew Hamblin, Radha Shah

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008051655 de
12/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/098917 de
21/08/2008

(57) Resumo: "ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE TRANSFORMADA, TRANSFECTADA OU TRANSDUZIDA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPO OU DE FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT-DE-PARTES, MÉTODO PARA TRATAR UM PACIENTE HUMANO AFLIGIDO COM CÂNCER, E, USO DE ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO". A presente invenção refere-se aos anticorpos ou aos fragmentos de ligante de antígeno dos mesmos que especificamente se ligam em IGF-1R, especialmente hIGF-1R. Também são reveladas preparações de anticorpo compreendendo anticorpos ou fragmentos de ligante de antígeno. Métodos de produção de tais anticorpos ou fragmentos de ligante de antígeno e usos dos mesmos também estão incluídos dentro do escopo da presente invenção.

“ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE TRANSFORMADA, TRANSFECTADA OU TRANSDUZIDA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPO OU DE FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT-DE-PARTES, E, USO DE ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO”

A presente invenção refere-se aos anticorpos e seus fragmentos de ligante de antígeno que especificamente se ligam em Receptor de Fator de Crescimento Insulina-semelhante de humano (hIGF-1R). A presente invenção também concerne aos métodos de tratar doenças ou distúrbios com ditos anticorpos e seus fragmentos de ligante de antígeno, composições farmacêuticas compreendendo ditos anticorpos e seus fragmentos de ligante de antígeno e métodos de manufatura.

Fundamentos

O receptor de fator de crescimento insulina-semelhante de humano (também conhecido como IGF-1R, CD221 ou EC 2.7.112) é um receptor de tirosina quinase com 70% de homologia com o receptor de insulina. O receptor é ativado por dois ligantes - IGF-I e IGF-II que se ligam no receptor com afinidade alta. O receptor é um dímero $\alpha\beta$ ligado por dissulfeto, denotado $(\alpha\beta)_2$. A cadeia- α é inteiramente extracelular enquanto que a cadeia- β atravessa a membrana e tem tanto um domínio extracelular quanto um domínio de sinalização intracelular. A ativação de receptor mediada por ligante aciona eventos intracelulares das rotas de MAPK e PI3K-proteína quinase B. Embora IGF-1R seja conhecido por ter um papel essencial em desenvolvimento e crescimento fetal e pós-natal normais, também é assumido um papel importante em biologia de câncer e tem estado implicado em numerosas rotas biológicas tais como mitogênese, transformação e

proteção contra apoptose (revisto extensivamente em Baserga et al. (1997) *Endocrine*, 7(1):99-102, Baserga (2003) *Int J Cancer*, 107(6):873-7, Larsson et al. (2005) *Br J Cancer*, 92(12):2097-101, Romano (2003) *Drug News Perspect*, 16(8):525-31). Ademais é sabido que os níveis de expressão de receptor estão supra-regulados em uma variedade de tipos de tumor (revisto por Khandwala et al. (2000) *Endocr Rev.*, 21(3):215-44) e níveis aumentados do ligante IGF-I estão associados com um risco aumentado de desenvolver câncer de próstata (Chan et al. (1998) *Science*, 279(5350):563-6).

São conhecidos antagonistas da rota de sinalização de IGF-1R por causa de seus efeitos de anti-tumor in vitro e in vivo (revisto em Hofmann et al. (2005) *Drug Discov Today*, 10(15): 1041-7 e Zhang et al. (2004) *Expert Opin Investig Drugs*, 13(12): 1569-77). Abordagens incluem anticorpos neutralizadores (veja Kull et al. (1983) *J Biol Chem.*, 258(10):6561-6 e Li et al., (1993) *Cancer Immunol Immunother.*, 49(4-5):243-52, Xiong et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89(12):5356-60, Burtrum et al. (2003) *Cancer Res.*, 63(24):8912-21, Cohen et al. (2005) *Clin Cancer Res.*, 11(5):2063-73, Maloney et al. (2003) *Cancer Res.*, 63(16):5073-83, Jackson-Booth et al. (2003) *Horm Metab Res.*, 35(11-12):850-6), anti-senso (veja Resnicoff et al. (1994) *Cancer Res.*, 54(18):4848-50, Lee et al. (1996) *Cancer Res.*, 56(13):3038-41, Muller et al. (1998) *Int J Cancer.*, 77(4):567-71, Trojan et al. (1993) *Science*, 259(5091):94-7, Shapiro et al. (1994) *J Clin Invest.*, 94(3): 1235-42), mutantes negativos dominantes (Prager et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91(6):2181-5) e inibidores de tirosina quinase de molécula pequena (veja Hopfner et al. (2006) *Biochem Pharmacol.* 2006, 71(10):1435-48 e proteínas ligantes de IGF (IGFBPs - veja Nickerson et al. (1997) *Biochem Biophys Res Commun.*, 237(3):690-3). Anticorpos monoclonais conhecidos incluem aqueles descritos em: WO99/60023, WO03/100008, WO02/053596, WO04/071529, EP0629240B, WO03/059951, WO03/106621, WO04/083248, WO04/087756, US2006452167A. Contudo, há uma

necessidade de anticorpos com função efetora aperfeiçoada, por exemplo com função de CDC e/ou de ADCC aperfeiçoada.

5 Estruturas de anticorpo são bem conhecidas na técnica e em particular é sabido que a região constante de cadeia pesada tem uma cadeia de açúcar glicosilada, esta pode ser uma cadeia de açúcar ligada por N-glicosídeo por exemplo N-acetil-glicosamina e pode ou não estar fucosilada.

Métodos para medir os níveis de fucosilação são bem conhecidos na técnica por exemplo, para uma população de anticorpos, hidrólise ácida pode ser usada para remover os monossacarídeos da cadeia de açúcar glicosilada do anticorpo e estas podem ser marcadas com um corante tal como ácido 2-amino-benzóico (2-AA). Cromatografia líquida de desempenho alto em fase reversa com detecção por fluorescência pode ser então realizada e uma curva padrão construída para quantificação de amostra. A razão de fucose para manose por população de anticorpos pode ser então calculada.

10
15

Descrição Breve das Figuras

Figura 1: Ligação de anticorpos monoclonais murinos purificados para IGF-1R de humano detectado por ELISA.

Figuras 2A-E: Ligação de anticorpos humanizado 6E11 e quimérico 6E11 purificado em IGF-1R de humano determinada por ELISA. Em Figura 2A, a curva de ligação para H0L0 foi deslocada para a direita devido ao fato de que o anticorpo estava em concentração muito baixa e não pôde ser acuradamente quantificado. Em Figura 2D, embora a tendência geral fosse similar, o sinal foi reduzido comparado com outros ensaios.

20

Figura 3: Regulação negativa de receptor IGF-1R após incubação de células 3T3/LISN c4 por 24 horas com anticorpo monoclonal murino 6E11 para IGF-1R de humano.

25

Figura 4: Regulação negativa de receptor IGF-1R após incubação de células NCI-H838 por até 24 horas com anticorpo H0L0

humanizado para IGF-1R de humano.

Figura 5: Regulação negativa de receptor IGF-1R e receptor de Insulina após incubação de células NCI-H838 por 24 horas com H0L0, H0L0 IgG1m(AA) ou IgG de humano não-selecionadora.

5 Figura 6: Histograma de intensidade fluorescente para níveis IGF-1R em populações de granulócitos e linfócitos após incubação com H0L0 a 4°C e 37°C.

Figura 7: Histograma de intensidade fluorescente para níveis de IGF-1R em populações de linfócitos e granulócitos após incubação com H0L0 a 4°C e 37°C comparado com um controle de isótipo.

Figura 8: Inibição de fosforilação de receptor mediada por anticorpos monoclonais murinos purificados 6E11, 5G4 e 15D9.

Figura 9: mostra um exemplo da inibição de fosforilação de receptor mediada por H1L0 em comparação com o 6E11c.

15 Figura 10: mostra um exemplo da inibição de fosforilação de receptor mediada por H0L0 e H0L0 IgG1m(AA) e H1L0 e H10L0 IgG1m(AA).

Figura 11A: mostra um exemplo da atividade de vários anticorpos monoclonais murinos purificados no ELISA de competição.

20 Figura 11B: mostra um exemplo da atividade de H1L0 no ELISA de competição em comparação com 6E11c.

Figura 12A-C: ELISA de competição para demonstrar a capacidade de anticorpos humanizado 6E11 ou quimérico 611 ou monoclonal murino 6E11 para inibir a ligação de receptor IGF-1R em um segundo anticorpo neutralizador.

Figura 13A: Ligação de anticorpos monoclonais murinos purificados em IGF-1R de macaco cinomolgo recombinante determinada por ELISA.

Figura 13B: Ligação de anticorpos monoclonais humanizados

purificados em IGF-1R de macaco cinomolgo recombinante em comparação com a químera 6E11 (6E11c).

Figura 14: Elisa de ligação de recepto de insulina usando anticorpos monoclonais murinos purificados.

5 Figura 15: Elisa de ligação de recepto de insulina usando anticorpos humanizados purificados.

Figura 16: Ensaio de FACS para demonstrar que os anticorpos reconhecem a linhagem de célula de tumor Colo205.

Figura 17: Ensaio de FACS para demonstrar que os anticorpos reconhecem a linhagem de célula de tumor de carcinoma de pulmão NCI-H838.

10

Figura 18: Ensaio de FACS para demonstrar que os anticorpos reconhecem a linhagem de célula de tumor de carcinoma MCF7 e de célula de carcinoma de pulmão A549.

15 Figura 19: Imuno-histoquímica de amostras de tecido congeladas de amostras de próstata normal e de tumor usando anticorpo monoclonal murino purificado.

Figura 20: Imuno-histoquímica de amostras de tecido congeladas de amostras de tumor de mama usando anticorpo monoclonal murino purificado.

20

Figura 21: Imuno-histoquímica de amostras de tecido congeladas de amostras de tumor de mama usando anticorpos monoclonais quimérico 6E11 e humanizado H1L0.

Figura 22: Imuno-histoquímica de amostras de tecido de tumor congelado de amostras de tumor de mama usando anticorpo H0L0 biotinilado.

25

Figura 23: Inibição de proliferação de células 3T3/LISN c4 mediada por IGF-1R inibida por anticorpos monoclonais murinos purificados

Figura 24: Inibição de proliferação de células 3T3/LISN c4 mediada por IGF-1R inibida por anticorpos monoclonais quimérico 6E11 ou

humanizado H1L0 purificados.

Figura 25A-E: Inibição de proliferação de células 3T3/LISN c4 mediada por IGF-1R inibida anticorpos monoclonais 6E11 murinos purificados ou humanizados purificados.

5 Figura 26: Inibição de ciclo celular mediado por IGF por anticorpos monoclonais murinos purificados determinada por coloração com iodeto de propídio e citometria de fluxo.

 Figura 27: Reversão de proteção mediada por IGF-1 de apoptose induzida por camptotecina em células NCI-H838 por anticorpo monoclonal 6E11 murino.

10

 Figura 28: : Reversão de proteção mediada por IGF-1 de apoptose mediada por camptocetina em células A549 por anticorpos selecionados.

 Figura 29: Ausência de atividade agonística de anticorpo monoclonal murino purificado na presença de anticorpo de ligação cruzada.

15

 Figura 30: Atividade de anticorpo H0L0 em pré-adipócitos diferenciados em níveis basais de fosfo-AKT comparado com um anticorpo de controle negativo.

 Figura 31: Atividade de anticorpo H0L0 em níveis basais de fosfo-AKT em células A549.

20

 Figura:32 Atividade de anticorpos humanizados em níveis basais de fosforilação de receptor IGF-1R em células 3T3/LISNc4.

 Figura:33 Atividade de anticorpos humanizados cruzadamente ligados em níveis basais de fosforilação de receptor IGF-1R em células 3T3/LISn c4.

25

 Figura:34 Atividade de anticorpos humanizados sobre a proliferação de células NCI-H929 na ausência de estimulação de ligante.

 Figura 35: Inibição de crescimento de tumor 3T3/LISN em camundongos nus após tratamento com anticorpo monoclonal 6E11.

Figura 36: Inibição de crescimento de tumor 3T3/LISN c4 em camundongos nus após tratamento com anticorpo monoclonal 6E11.

Figura 37: Inibição de crescimento de tumor 3T3/LISN c4 em camundongos nus após tratamento com anticorpos monoclonais humanizado e 6E11.

Figura 38: Inibição de crescimento de tumor Colo205 em camundongos nus após tratamento com anticorpo monoclonal 6E11.

Figura 39: Cinética de ligação de receptor usando células NCI - H838 incubadas com H0L0.

Figura 40: IGF - Ensaio de ligação de heterodímero 1R/IR usando células Colo-205 e células NIH-3T3 recombinantes contra anticorpo 6E11, 6E11c e H0L0 mIgG(AA).

Figura 41: Proliferação de células NCI - H929 na presença de 6E11 e H0L0.

Figura 42: Determinação de estabilidade de H0L0 em soro.

Figura 43 : Regulação negativa de IGR-1R in vivo em células LISN/3T3 c4 após tratamento com H0L0 ou 6E11.

Descrição Breve das Tabelas.

Tabela 1: SEQ ID NO's das cadeias pesada e leve variáveis de hibridoma.

Tabela 2: Valores de IC50 para anticorpos selecionados em ensaios de fosforilação.

Tabela 2a: Valores de IC50 para anticorpos selecionados em ensaios de fosforilação s.

Tabela 3: Dados cinéticos para anticorpos monoclonais murinos.

Tabela 4: Dados cinéticos para anticorpos monoclonais humanizados.

Tabela 5: Dados cinéticos para anticorpos monoclonais

humanizados ambos de Fc inabilitado e de tipo selvagem.

Tabela 6: Dados cinéticos para anticorpos monoclonais humanizados.

5 Tabela 7: Dados cinéticos para anticorpos monoclonais humanizados.

Tabela 8: Dados cinéticos para anti-IGF-1R versus IGF-1R de humano e de macaco cinomolgo.

Tabela 9: Valores de inibição para a superfície de 200 RU's IGF-1.

10 Tabela 10: Valores de inibição para a superfície de 4000 RU's IGF-1.

Tabela 11: Neutralização de ligação de receptor em ligante.

Tabela 12: Sumário de análise de imuno-histoquímica de microarranjo de tecido *turnout*.

15 Tabela 13: Atividade de vários anticorpos em ensaio de fosforilação de AKT.

Tabela 14: Atividade de vários anticorpos em ensaio de fosforilação de AKT.

Sumário da Invenção

20 Em uma modalidade a invenção fornece um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em IGF-1R compreendendo CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1 ou uma sua variante que contém 1 ou 2 substituições de aminoácido na CDRH3.

25 Em uma modalidade a invenção fornece um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em IGF-1R, especificamente hIGF-1R e neutraliza a atividade de hIGF-1R, que compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1 ou suas variantes nas quais um ou dois resíduos de aminoácido dentro de CDRH3 diferem dos resíduos de aminoácido na posição

correspondente em SEQ. ID. NO: 1.

Também é fornecido um método de produzir um anticorpo como aqui descrito compreendendo expressar em uma linhagem celular um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo.

5 Em outra modalidade é fornecido um kit-de-partes compreendendo a composição aqui descrita junta com instruções para uso.

Também é fornecido um método para tratar um paciente humano afligido com câncer cujo método compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da preparação de anticorpo aqui descrita.

10 Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção fornece um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em IGF-1R, por exemplo que especificamente se liga em hIGF-1R.

15 Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em hIGF-1R e neutraliza a atividade de hIGF-1R, que compreende um domínio variável de cadeia pesada que especificamente se liga em IGF-1R compreendendo CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1 ou suas variantes nas quais um
20 ou dois resíduos de aminoácido dentro de CDRH3 diferem dos resíduos de aminoácido na posição correspondente em SEQ. ID. NO: 1.

Em outra modalidade da presente invenção estas diferenças em resíduos de aminoácido são substituições conservativas.

25 Em outra modalidade da invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em IGF-1R e compreende uma CDRH3 que é uma variante da sequência mostrada em SEQ ID NO:1 na qual um ou dois resíduos dentro de dita CDRH3 de dita variante difere(m) do resíduo na posição correspondente em SEQ ID NO:1 em posição 7 e/ou posição 9 (onde o primeiro resíduo está em

posição 1, W, e onde o último resíduo, V, está em posição 14).

Em uma outra modalidade da invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em IGF-1R e compreende uma CDRH3 que é uma variante da
5 seqüência mostrada em SEQ ID NO:1 na qual um ou dois resíduos dentro de dita CDRH3 de dita variante difere(m) do resíduo na posição correspondente em SEQ ID NO:1 por uma substituição de R em S na posição 7, ou por uma substituição de K em R na posição 9, ou por uma substituição de R em S na
posição 7 e K em R na posição 9.

10 Em outra modalidade da invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo adicionalmente compreendendo uma ou mais das seguintes seqüências CDRH2 como mostrada em SEQ. ID. NO: 2, CDRH1 como mostrada em SEQ. ID. NO: 3, CDRL1 como mostrada em SEQ. ID. NO: 4, CDRL2 como mostrada em SEQ. ID. NO: 5, e CDRL3
15 como mostrada em SEQ. ID. NO: 6.

Em uma modalidade da invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo sendo que CDRH1, H2 e H3 e CDR L1 e L3 são de 6E11 e CDR L2 é de 9C7.

Em outra modalidade da presente invenção uma ou mais das
20 CDR's do anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo podem compreender variantes das CDR's mostradas nas seqüências listadas acima. Cada CDR variante compreenderá um ou dois resíduos de aminoácido que diferem do resíduo de aminoácido na posição correspondente na seqüência listada. Tais substituições em resíduos de aminoácido por substituições
25 conservativas, por exemplo, substituindo um aminoácido hidrofóbico por um aminoácido hidrofóbico alternativo, por exemplo substituindo Leucina por Valina, ou Isoleucina.

Em uma outra modalidade da invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo

CDRH3 e adicionalmente compreende uma ou mais das seguintes seqüências CDRH2: SEQ. ID. NO: 2, CDRH1: SEQ. ID. NO: 3, CDRL1: SEQ. ID. NO: 4, CDRL2: SEQ. ID. NO: 7, e CDRL3: SEQ. ID. NO: 6.

5 Em ainda uma outra modalidade da invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo CDRH3 e adicionalmente compreende uma ou mais das seguintes seqüências CDRH2: SEQ. ID. NO: 2, CDRH1: SEQ. ID. NO: 3, CDRL1: SEQ. ID. NO: 4, CDRL2: SEQ. ID. NO: 7, e CDRL3: SEQ. ID. NO: 6 sendo que uma ou mais das CDR's podem ser substituídas por uma sua variante, cada CDR
10 variante contendo 1 ou 2 substituições de aminoácido.

Em uma modalidade o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo da presente invenção compreende CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1 e CDRH1 de SEQ. ID. NO: 3. Em uma outra modalidade o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreende CDRH3 de SEQ
15 ID NO: 1 e CDR L2 de SEQ. ID. NO: 7. Em ainda uma outra modalidade o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo da presente invenção compreende CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1 e CDRH1 de SEQ. ID. NO: 3. e CDR L2 de SEQ. ID. NO: 7.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um
20 anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a invenção aqui descrita e adicionalmente compreendendo as seguintes CDR's:

CDRH1: SEQ. ID. NO: 3
CDRH2: SEQ. ID. NO: 2
CDRH3: SEQ. ID. NO: 1
25 CDRL1: SEQ. ID. NO: 4
CDRL2: SEQ. ID. NO: 7
CDRL3: SEQ. ID. NO: 6

Em outra modalidade da invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em

IGF-1R e compreende CDR's que são variantes das seqüências mostradas acima.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em IGF-1R e compreende um domínio variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO: 8 e um domínio variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO: 9, ou um domínio variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO: 10 e um domínio variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO: 11, ou um domínio variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO: 12 e um domínio variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO: 13, ou um domínio variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO: 14 e um domínio variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO: 16, ou um domínio variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO: 15 e um domínio variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO: 16.

Em outra modalidade da invenção é fornecido um domínio variável de cadeia pesada isolado de um anticorpo compreendendo SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 ou SEQ ID NO: 15, por exemplo ele compreende SEQ ID NO: 12.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo CDR's de acordo com a invenção aqui descrita, ou domínios variáveis de cadeia pesada ou leve de acordo com a invenção aqui descrita, sendo que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo é de rato, camundongo, primata (e.g. macaco cinomolgo, macaco do Velho Mundo ou Macaco Antropóide Grande) ou humano.

Em outra modalidade da presente invenção o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo aqui descrito adicionalmente se liga em IGF-1R de primata, por exemplo IGF-1R de macaco cinomolgo.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo

uma ou mais das seguintes CDR's: CDRH3 como mostrada em como mostrada em SEQ. ID. NO: 1, CDRH2 como mostrada em SEQ. ID. NO: 2, CDRH1 como mostrada em SEQ. ID. NO: 3, CDRL1 como mostrada em SEQ. ID. NO: 4, CDRL2 como mostrada em SEQ. ID. NO: 5 e CDRL3 como mostrada em SEQ. ID. NO: 6 no contexto de um molde humano, por exemplo como um anticorpo humanizado ou quimérico.

Em outra modalidade da presente invenção o domínio variável de cadeia pesada humanizada compreende as CDR's listadas em SEQ ID NO: 1-3 dentro de um molde de anticorpo acceptor tendo mais do que 80% de identidade nas regiões de molde, ou mais do que 85%, ou mais do que 90%, ou mais do que 95%, ou mais do que 98%, ou mais do que 99% de identidade nas regiões de molde com a seqüência aceptora humana em SEQ ID NO: 59.

Em outra modalidade da presente invenção o domínio variável de cadeia leve humanizada compreende as CDR's listadas em SEQ ID NO: 4-6 dentro de um molde de anticorpo acceptor tendo mais do que 80% de identidade nas regiões de molde, ou mais do que 85%, ou mais do que 90%, ou mais do que 95%, ou mais do que 98%, ou mais do que 99% de identidade nas regiões de molde com a seqüência aceptora humana em SEQ ID NO: 60.

Em SEQ ID NO: 59 e SEQ ID NO: 60 a posição das seqüências de CDR têm sido denotadas como Xaa's.

Em uma modalidade da invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo CDR's de acordo com a invenção aqui descrita, ou domínios variáveis de cadeia pesada ou cadeia leve de acordo com a invenção aqui descrita sendo que o anticorpo tem uma meia-vida de pelo menos 5 dias, ou pelo menos 7 dias ou pelo menos 9 dias em um modelo animal murino.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo CDR's de acordo com a invenção aqui descrita, ou domínios variáveis de

cadeia pesada ou leve de acordo com a invenção descrita sendo que o anticorpo adicionalmente compreende uma região constante, que pode ser qualquer isótipo ou subclasse. Em uma modalidade a região constante de cadeia pesada é do isótipo IgG, por exemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ou suas
5 variantes. Em uma modalidade o anticorpo é IgG1.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo de acordo com a invenção aqui descrita e compreendendo uma região constante de tal modo que o anticorpo tem funcionalidade efetora ou de ativação de complemento e/ou ADCC reduzida. Em uma tal modalidade a
10 região constante de cadeia pesada pode compreender uma região constante naturalmente inabilitada de isótipo IgG2 ou IgG4 ou uma região constante de IgG1 mutada. Exemplos de modificações adequadas são descritos em EP0307434. Um exemplo compreende as substituições de resíduos de alanina nas posições 235 e 237 (numeração de índice EU).

15 Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo de acordo com a invenção aqui descrita sendo que o anticorpo é capaz de pelo menos alguma função efetora por exemplo sendo que ele é capaz de alguma função de ADCC e/ou CDC. Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo compreendendo uma região
20 constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante que especificamente se liga em IGF-1R, por exemplo IGF-1R de humano compreendendo CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1 ou sua variante que contém 1 ou 2 substituições de aminoácido na CDRH3, por exemplo um anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de
25 ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante compreendendo CDR's selecionadas de CDRH1: SEQ. ID. NO: 3, CDRH2: SEQ. ID. NO: 2, CDRH3: SEQ. ID. NO: 1, CDRL1: SEQ. ID. NO: 4, CDRL2: SEQ. ID. NO: 7 e CDRL3: SEQ. ID. NO: 6, e que adicionalmente compreende uma região constante de IgG1 de tipo selvagem, IgG2 de tipo

selvagem, IgG3 de tipo selvagem, IgG4 de tipo selvagem ou suas versões aperfeiçoadas.

Em outra modalidade da presente invenção o anticorpo aqui descrito compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante, especificamente se liga em um receptor de fator de crescimento selecionado de IGF-1R, EGFR, HER-2 ou HER-3. Por exemplo que especificamente se liga em HER-2 ou HER-3 ou por exemplo que especificamente se liga em IGF-1R ou EGFR, por exemplo IGF-1R de humano.

Em uma modalidade o anticorpo da presente invenção está ligado em um ou mais anticorpos de domínio com especificidade por VEGF ou EGFR.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a invenção aqui descrita que compreende uma ou mais mutações em sua região constante de cadeia pesada de tal modo que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem função efetora aperfeiçoada. Por exemplo, sendo que ele tem ADCC aperfeiçoada ou CDC aperfeiçoada ou sendo que ele tem ambas funções efetoras de ADCC e de CDC aperfeiçoadas. Exemplos de modificações adequadas são descritos em Shields et al. J. Biol. Chem (2001) 276:6591-6604, Lazar et al. PNAS (2006) 103:4005-4010 e US6737056, WO2004063351 e WO2004029207. Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligada em uma região constante de cadeia pesada que especificamente se liga em IGF-1R, por exemplo IGF-1R de humano. O anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo pode compreender CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1 ou suas variantes nas quais um ou dois resíduos de aminoácido dentro de CDRH3 diferem dos resíduos de aminoácido na posição correspondente em

SEQ. ID. NO: 1 e compreendendo uma região constante de cadeia pesada mutada de tal modo que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo tem função efetora aperfeiçoada comparado com o tipo selvagem. Por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em IGF-1R compreendendo CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1, por exemplo um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo CDR's selecionadas de CDRH1: SEQ. ID. NO: 3, CDRH2: SEQ. ID. NO: 2, CDRH3: SEQ. ID. NO: 1, CDRL1: SEQ. ID. NO: 4, CDRL2: SEQ. ID. NO: 7 e CDRL3: SEQ. ID. NO: 6 e compreendendo uma região constante de cadeia pesada mutada de tal modo que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo tem função efetora aperfeiçoada comparado com o tipo selvagem. Em outra modalidade da presente invenção, tais mutações estão em uma ou mais posições selecionadas de 239, 332 e 330 (IgG1), ou posições equivalentes em outros isótipos de IgG. Exemplos de mutações adequadas são S239D e I332E e A330L. Em uma modalidade o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno está mutado nas posições 239 e 332, por exemplo S239D e I332E, por exemplo está mutado em três ou mais posições selecionadas de 239 e 332 e 330, por exemplo S239D e I332E e A330L.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligada em uma região constante de cadeia pesada de acordo com a invenção aqui descrita e compreendendo uma região constante selecionada daquelas mostradas em SEQ ID NO: 64 e SEQ ID. NO: 66, por exemplo um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno compreendendo os domínios variáveis de SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 15 junto com a região constante de cadeia pesada como mostrada em SEQ ID NO: 64 ou SEQ ID NO: 66, por exemplo um anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou fragmento de

ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 64. Em uma outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou
5 fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de cadeia pesada de acordo com a invenção aqui descrita e compreendendo uma região constante de cadeia pesada selecionada daquelas mostradas em SEQ ID NO: 64 e SEQ ID. NO: 66, por exemplo anticorpo ou
10 fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo os domínios variáveis de SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16 junto com a região constante de cadeia pesada como mostrada em SEQ ID NO: 64 ou SEQ ID NO: 66, por exemplo um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 e SEQ ID NO: 64.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um
15 anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de cadeia pesada de acordo com a invenção aqui descrita que compreende uma região constante de cadeia pesada com um perfil de glicosilação alterado de tal modo que o anticorpo ou fragmento de ligante de
20 antígeno do mesmo tem função efetora aperfeiçoada. Por exemplo, sendo que ele tem ADCC aperfeiçoada ou CDC aperfeiçoada ou sendo que ele tem ambas as funções efetoras de ADCC e CDC aperfeiçoadas. Exemplos de tais metodologias para produzir anticorpos com um perfil de glicosilação alterado são descritos em WO2003011878, WO2006014679 e EP1229125.

25 Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de cadeia pesada de acordo com a invenção aqui descrita que especificamente se liga em IGF-1R, por exemplo IGF-1R de humano. O

anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo pode compreender CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1 ou suas variantes nas quais um ou dois resíduos de aminoácido dentro de CDRH3 diferem dos resíduos de aminoácido na posição correspondente em SEQ. ID. NO: 1 e compreendendo uma região constante de cadeia pesada com um perfil de glicosilação alterado de tal modo que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem função efetora aperfeiçoada quando comparado com o tipo selvagem.

Por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que especificamente se liga em IGF-1R, por exemplo IGF-1R de humano compreendendo CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1, por exemplo um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo CDR's selecionadas de CDRH1: SEQ. ID. NO: 3, CDRH2: SEQ. ID. NO: 2, CDRH3: SEQ. ID. NO: 1, CDRL1: SEQ. ID. NO: 4, CDRL2: SEQ. ID. NO: 7 e CDRL3: SEQ. ID. NO: 6 e compreendendo uma região constante de cadeia pesada com um perfil de glicosilação alterado de tal modo que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem função efetora aperfeiçoada quando comparado com o tipo selvagem.

Em uma modalidade a invenção fornece uma preparação de anticorpo sendo que a razão de fucose para manose em dita preparação de anticorpo é 0,8:3 ou menos, por exemplo é 0,7:3 ou menos, ou é 0,6:3 ou menos ou é 0,5:3 ou menos ou é 0,4:3 ou menos ou é 0,3:3 ou menos, ou é 0,2:3 ou menos ou é 0,1:3 ou menos. Em uma modalidade a preparação de anticorpo contém fucose não ligada ou desprezível.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecida uma preparação de anticorpo compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo os domínios variáveis de SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16 e sendo que a razão de fucose para manose em dita preparação de anticorpo é 0,8:3 ou menos, por exemplo é 0,7:3 ou menos, ou é 0,6:3 ou menos ou é 0,5:3 ou

menos ou é 0,4:3 ou menos ou é 0,3:3 ou menos, ou é 0,2:3 ou menos ou é 0,1:3 ou menos. Em uma modalidade a preparação de anticorpo contém fucose não ligada ou desprezível.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de cadeia pesada de acordo com a invenção aqui descrita que compreende uma região constante de cadeia pesada mutada e um perfil de glicosilação alterado de tal modo que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem função efetora aperfeiçoada, por exemplo sendo que ele tem uma ou mais das seguintes funções, ADCC aperfeiçoada ou CDC aperfeiçoada, por exemplo sendo que ele tem função de ADCC aperfeiçoada.

Em uma modalidade da invenção é fornecida uma preparação de anticorpo compreendendo anticorpos como aqui descrito que compreende uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina, ou seus fragmentos de ligante de antígeno que estão ligados em uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina sendo que dita região constante de cadeia pesada de imunoglobulina concede uma função efetora ao anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno, e sendo que dito anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno especificamente se liga em um receptor de fator de crescimento e sendo que dita região constante de cadeia pesada de imunoglobulina está mutado em pelo menos 2 posições e tem um perfil de glicosilação alterado de tal modo que a razão de fucose para manose é 0,8:3 ou menos de modo que dito anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem uma função efetora aperfeiçoada em comparação com um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno equivalente com uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina faltante de ditas mutações e perfil de glicosilação alterado. O perfil de glicosilação alterado de dita preparação de anticorpo não é uma consequência de ditas mutações em cadeia pesada de

imunoglobulina.

Por exemplo, tais anticorpos ou fragmentos de ligante de antígeno especificamente se ligam em IGF-1R, por exemplo IGF-1R de humano e compreendem CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1, por exemplo um
 5 anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno compreendendo CDR's selecionadas de CDRH1: SEQ. ID. NO: 3, CDRH2: SEQ. ID. NO: 2, CDRH3: SEQ. ID. NO: 1, CDRL1: SEQ. ID. NO: 4, CDRL2: SEQ. ID. NO: 7 e CDRL3: SEQ. ID. NO: 6 e compreendem uma região constante de cadeia pesada mutada e têm um perfil de glicosilação alterado de tal modo que o
 10 anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem função efetora aperfeiçoada. Por exemplo tais anticorpos ou fragmentos de ligante de antígeno pode compreender os domínios variáveis de SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16.

Em uma tal modalidade, as mutações estão em uma ou mais
 15 das posições selecionadas de 239, 332 e 330 (IgG1), ou posições equivalentes em outros isótipos de IgG. Exemplos de mutações adequadas são S239D e I332E e A330L. Em uma modalidade o anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante tem uma mutação em 239 e 332, por exemplo S239D e
 20 I332E ou adicionalmente pode compreender mutações em três ou mais posições selecionadas de 239 e 332 e 330, por exemplo S239D e I332E e A330L.

Em uma modalidade a razão de fucose para manose em dita preparação de anticorpo é 0,8:3 ou menos, por exemplo é 0,7:3 ou menos, ou
 25 é 0,6:3 ou menos ou é 0,5:3 ou menos ou é 0,4:3 ou menos ou é 0,3:3 ou menos, ou é 0,2:3 ou menos ou é 0,1:3 ou menos. Em uma modalidade a preparação de anticorpo contém fucose não ligada ou desprezível.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou

fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de cadeia pesada de acordo com a invenção aqui descrita que compreende uma região constante de cadeia pesada quimérica por exemplo sendo que ele compreende pelo menos um domínio CH2 de IgG3 de tal modo

5 que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem função efetora aperfeiçoada, por exemplo sendo que ele tem uma ou mais das seguintes funções, ADCC aperfeiçoada ou CDC aperfeiçoada, por exemplo sendo que ele tem CDC aperfeiçoada. Por exemplo o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno pode compreender um domínio CH2 de IgG3 ou ambos domínios

10 CH2 podem ser de IgG3.

Em uma outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de cadeia pesada de acordo com a invenção aqui descrita que

15 compreende uma região constante de cadeia pesada quimérica e mutada por exemplo sendo que ele compreende pelo menos um domínio CH2 de IgG3 e um domínio CH2 de IgG1 sendo que o domínio CH2 de IgG1 tem uma ou mais mutações nas posições selecionadas de 239 e 332 e 330, por exemplo as mutações são selecionadas de S239D e I332E e A330L de tal modo que o

20 anticorpo tem função efetora aperfeiçoada, por exemplo sendo que ele tem uma ou mais das seguintes funções, ADCC aperfeiçoada ou CDC aperfeiçoada, por exemplo sendo que ele tem ADCC aperfeiçoada e CDC aperfeiçoada. Em uma modalidade o domínio CH2 de IgG1 tem as mutações S239D e I332E.

25 Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de cadeia pesada de acordo com a invenção aqui descrita que compreende uma região constante de cadeia pesada quimérica e um perfil de

glicosilação alterado de tal modo que a região constante de cadeia pesada compreende pelo menos um domínio CH2 de IgG3 e um domínio CH2 de IgG1 e que tem um perfil de glicosilação alterado de tal modo que a razão de fucose para manose é 0,8:3 ou menos de modo que dito anticorpo ou
5 fragmento de ligante de antígeno tem uma função efetora aperfeiçoada em comparação com um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno equivalente com uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina faltante de ditas mutações e perfil de glicosilação alterado, de tal modo que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem função efetora
10 aperfeiçoada, por exemplo sendo que ele tem uma ou mais das seguintes funções, ADCC aperfeiçoada ou CDC aperfeiçoada, por exemplo sendo que ele tem ADCC aperfeiçoada e CDC aperfeiçoada.

Em uma modalidade alternativa o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem pelo menos um domínio CH2 de IgG3 e pelo menos
15 um domínio constante de cadeia pesada de IgG1 sendo que ambos os domínios CH2 de IgG estão mutados de acordo com as limitações aqui descritas.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecida uma preparação de anticorpo compreendendo um anticorpo compreendendo uma
20 região constante de cadeia pesada ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de cadeia pesada que compreende uma região constante de cadeia pesada quimérica e mutada sendo que dita preparação de anticorpo tem um perfil de glicosilação alterado de tal modo que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem função efetora
25 aperfeiçoada, por exemplo sendo que ele tem uma ou mais das seguintes funções, ADCC aperfeiçoada ou CDC aperfeiçoada. Em uma modalidade as mutações são selecionadas de posições 239 e 332 e 330, por exemplo as mutações são selecionadas de S239D e I332E e A330L. Em uma outra modalidade a região constante de cadeia pesada compreende pelo menos um

domínio CH2 de IgG3 e um domínio CH2 de IgG1. Em uma modalidade a região constante de cadeia pesada tem um perfil de glicosilação alterado de tal modo que a razão de fucose para manose é 0,8:3 ou menos de modo que dito anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno tem uma função efetora

5 aperfeiçoada em comparação com um anticorpo não quimérico equivalente ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo com uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina faltante de ditas mutações e perfil de glicosilação alterado.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido uma

10 célula hospedeira recombinante transformada, transfectada ou transduzida compreendendo pelo menos um cassete de expressão, por exemplo onde o cassete de expressão compreende um polinucleotídeo codificador de uma cadeia pesada de um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a invenção aqui descrita e adicionalmente compreende um

15 polinucleotídeo codificador de uma cadeia leve de um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a invenção aqui descrita ou onde há dois cassetes de expressão e o 1º codifica a cadeia leve e o segundo codifica a cadeia pesada. Por exemplo em uma modalidade o primeiro cassete de expressão compreende um polinucleotídeo codificador de uma cadeia

20 pesada de um anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita e adicionalmente compreende um segundo cassete compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma cadeia leve de um anticorpo compreendendo uma região constante ou

25 fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita por exemplo o primeiro cassete de expressão compreende um polinucleotídeo codificador de uma cadeia pesada selecionada de SEQ. ID. NO: 40, SEQ. ID. NO: 41 ou SEQ. ID. NO: 67 ou SEQ. ID. NO: 70 e um segundo cassete de expressão

compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma cadeia leve selecionada de SEQ. ID. NO: 42 ou SEQ. ID. NO: 69.

Em outra modalidade da invenção é fornecido uma célula hospedeira estavelmente transformada compreendendo um vetor
5 compreendendo um ou mais cassetes de expressão codificadores de uma cadeia pesada e/ou uma cadeia leve do anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante como aqui descrito. Por exemplo tais células hospedeiras podem compreender um primeiro vetor codificador da cadeia
10 leve e um segundo vetor codificador da cadeia pesada, por exemplo o primeiro vetor codifica uma cadeia pesada selecionada de SEQ. ID. NO: 37, SEQ. ID. NO: 38 ou SEQ. ID. NO: 68 e um segundo vetor codificador de uma cadeia leve por exemplo a cadeia leve de SEQ ID NO: 39.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecida uma
15 célula hospedeira de acordo com a invenção aqui descrita sendo que a célula é eucariótica, por exemplo onde a célula é de mamífero. Exemplos de tais linhagens de célula incluem CHO ou NSO.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um método para a produção de um anticorpo compreendendo uma região
20 constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita cujo método compreende a etapa de cultivar uma célula hospedeira em um meio de cultura, por exemplo meio de cultura livre de soro. Também é fornecido um método de produzir um anticorpo como aqui descrito compreendendo expressar em
25 uma linhagem celular um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que tem sido adaptado para regular a presença ou ausência de ligação de fucose em uma cadeia de açúcar ligada em N-glicosídeo que se liga na molécula imunologicamente funcional.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um

método de acordo com a invenção aqui descrita sendo que dito anticorpo é adicionalmente purificado para pelo menos 95% ou mais (e.g. 98% ou mais) com respeito ao dito anticorpo contendo meio de cultura livre de soro.

5 Em outra modalidade da presente invenção é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita e um veículo farmaceuticamente aceitável.

10 Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um kit-de-partes compreendendo a composição de acordo com a invenção aqui descrita junto com instruções para uso.

15 Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um método para tratar um paciente humano afligido com artrite reumatóide cujo método compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita. O anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante pode estar em combinação com um veículo
20 farmaceuticamente aceitável.

25 Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um método para tratar um paciente humano afligido com câncer cujo método compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita. O anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante pode estar em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um método para tratar um paciente humano afligido com retinopatia diabética cujo método compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo compreendendo uma região constante ou
5 fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita. O anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante pode estar em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

10 Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um método para tratar um paciente humano afligido com degeneração macular cujo método compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo compreendendo uma região constante ou
15 fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita. O anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante pode estar em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

20 Em uma outra modalidade da presente invenção é fornecido um método para tratar um paciente humano afligido com câncer cujo método compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica compreendendo um anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está
25 ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido o uso de um anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo que está ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita na manufatura de um medicamento para

- o tratamento de uma doença ou um distúrbio selecionada(o) do grupo consistindo de doenças neovascularização tais como Retinopatia Diabética Proliferativa, glaucoma neovascular e Degeneração Macular Relacionada com a Idade (AMD) também doenças ou distúrbios selecionadas(os) do grupo
- 5 consistindo de; Artrite reumatóide, Psoríase ou Cânceres por exemplo: Leucemia Linfoblástica Aguda, Carcinoma Adrenocortical, Cânceres Relacionados com AIDS, Linfoma Relacionado com AIDS, Câncer Anal, Astrocitoma Cerebelar da Infância, Astrocitoma Cerebral da Infância, Câncer Colorretal, Carcinoma de Célula Basal, Câncer de Duto Biliar Extra-hepático,
- 10 Câncer de Bexiga, Osteossarcoma/Câncer Ósseo Histocitoma Fibroso Maligno, Tumores Cerebrais (e.g., Glioma de Tronco Cerebral, Astrocitoma Cerebelar, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Ependimoma, Meduloblastoma, Tumores Neuroectodermas Primitivos Supratentoriais, Glioma Hipotalâmico e de Via Visual), Câncer de Mama,
- 15 Carcinóides/Adenocarcinomas Bronquiais, Linfoma de Burkitt, Tumor Carcinóide, Tumor Carcinóide Gastrointestinal, Carcinoma de Sítio Primário Desconhecido, Carcinoma de Sistema Nervoso Central Primário, Astrocitoma Cerebelar, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Câncer Cervical, Cânceres da Infância, Leucemia Linfocítica Crônica, Leucemia Mielógena Crônica,
- 20 Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Cólon, Câncer Colorretal, Linfoma de Célula-T Cutânea, Câncer Endometrial, Ependimoma, Câncer Esofágico, Família de Tumores de Ewing, Tumor de Célula Germinativa Extracranial, Tumor de Célula Germinativa Extragonadal, Câncer de Duto Biliar Extra-hepático, Câncer Ocular Melanoma Intraocular, Câncer Ocular
- 25 Retinoblastoma, Câncer de Vesícula Biliar, Câncer Gástrico (Estômago), Tumor Carcinóide Gastrointestinal, Tumores de Célula Germinativa (e.g., Extracranial, Extragonadal, e Ovariano), Tumor Trofoblástico Gestacional, Glioma (e.g., Adulto, Tronco Cerebral da Infância, Astrocitoma Cerebral da Infância, de Via Visual da Infância e Hipotalâmico), Leucemia de Célula

- Pilosa, Câncer de Cabeça e Pescoço, Câncer Hepatocelular (Fígado), Linfoma de Hodgkin, Câncer Hipofaríngeo, Glioma de Via Visual e Hipotalâmico, Melanoma Intraocular, Carcinoma de Célula das Ilhotas (Pâncreas Endócrino), Sarcoma de Kaposi, Câncer de Rim (Célula Renal), Câncer
- 5 Laríngeo, Leucemia (e.g., Linfoblástica Aguda, Mielóide Aguda, Linfocítica Crônica, Mielógena Crônica, e Célula Pilosa), Câncer de Cavidade Oral e de Lábio, Câncer de Fígado, Câncer de Pulmão de Célula Não-Pequena, Câncer de Pulmão de Célula Pequena, Linfoma (e.g., Relacionado com AIDS, de Burkitt, de Célula-T Cutânea, de Hodgkin, de Não-Hodgkin, e Sistema
- 10 Nervoso Central Primário), Macroglobulinemia de Waldenstrom, Histiocitoma Fibroso Maligno de Osso/Osteossarcoma, Meduloblastoma, Melanoma, Melanoma Intraocular (Olho), Melanoma de Célula de Merkel, Mesotelioma, Câncer de Pescoço Escamoso Metastático com Síndrome de Neoplasia Endócrina Múltipla, Primária Oculta, Neoplasma de Célula
- 15 Plasmática/Mieloma Múltiplo, Micose Fungóide, Síndromes Mieloplásticas, Doenças Mieloproliferativas/Mielodisplásticas, Leucemia Mielógena, Leucemia Mielóide Crônica, Linfoma Múltiplo, Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Sino Paranasal e Cavidade Nasal, Câncer Nasofaríngeo, Neuroblastoma, Câncer Oral, Câncer Orofaríngeo
- 20 Osteossarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno de Osso, Câncer Ovariano, Câncer Epitelial Ovariano, Tumor de Célula Germinativa Ovariana, Tumor Potencial Maligno Baixo Ovariano, Câncer Pancreático, Câncer Pancreático de Célula das Ilhotas, Câncer de Cavidade Nasal e de Sino Paranasal, Câncer de Paratiróide, Câncer de Pênis, Feocromocitoma, Pineoblastoma, Tumor de
- 25 Pituitária, Neoplasma de Célula Plasmática/Linfoma Múltiplo, Blastoma Pleuropulmonar, Linfoma de Sistema Nervoso Central Primário, Câncer de Próstata, Câncer Retal, Câncer de Célula Renal (Rim), Câncer de Célula Transicional de Uretra e de Pélvis Renal, Retinoblastoma, Rabdomiossarcoma, Câncer de Glândula Salivar, Sarcoma de Tecido Mole,

Sarcoma Uterino, Síndrome de Sezary, Câncer de Pele Não-Melanoma, Carcinoma de Pele de Célula de Merkel, Câncer de Intestino Delgado, Sarcoma de Tecido Mole, Carcinoma de Célula Escamosa, Linfoma de Célula-T Cutânea, Câncer Testicular, Timoma, Carcinoma Tímico, Câncer de

5 Tiróide, Tumor Trofoblástico Gestacional, Carcinoma de Sítio Primário Desconhecido, Câncer de Sítio Primário Desconhecido, Câncer de Uretra, Câncer Uterino Endometrial, Sarcoma Uterino, Câncer Vaginal, Glioma Hipotalâmico e de Via Visual, Câncer Vulvar, Macroglobulinemia de Waldenstrom, e Tumor de Wilms.

10 Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um método de acordo com a invenção aqui descrita sendo que o paciente está afligido com um ou mais de: Retinopatia Diabética Proliferativa, Degeneração Macular Relacionada com a Idade (AMD), glaucoma neovascular, Artrite reumatóide, Psoríase, Câncer Colorretal, Câncer de Mama, Câncer de

15 Próstata, Câncer de Pulmão ou Mieloma

Definições

O termo “anticorpo” é aqui usado no sentido mais amplo e especificamente cobre anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos

20 multiespecíficos (e.g. anticorpos biespecíficos), e fragmentos de anticorpo desde que exibam a atividade biológica desejada. Estes são explicados mais tarde com mais detalhe.

O termo “anticorpo monoclonal” como aqui usado refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente

25 homogêneos i.e. os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto para as possíveis mutações naturalmente ocorrentes que podem estar presentes em quantidades menores. Anticorpos monoclonais são elevadamente específicos sendo direcionados contra um sítio de ligação antigênica único. Ademais, em contraste com as preparações de anticorpo

policlonal que tipicamente incluem anticorpos diferentes direcionados contra determinantes (epitopos) diferentes, cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno.

“Identidade,” significa, para polinucleotídeos e polipeptídeos, conforme for o caso, a comparação calculada usando um algoritmo derivado de (1) e (2) abaixo:

(1) Identidade para polinucleotídeos é calculada pela multiplicação do número total de nucleotídeos em uma dada seqüência pelo número inteiro definindo a identidade percentual dividido por 100, e então subtração daquele produto de dito número total de nucleotídeos em dita seqüência, ou:

$$nn \leq xn - (xn \bullet y)$$

sendo que nn é o número de alterações em nucleotídeo, xn é o número total de nucleotídeos em uma dada seqüência, y é 0,95 para 95%, 0,97 para 97% ou 1,00 para 100%, e \bullet é o símbolo para o operador de multiplicação, e sendo que qualquer produto não-inteiro de xn e y é arredondado para baixo para o número inteiro mais próximo antes da sua subtração de xn . Alterações de uma seqüência de polinucleotídeo codificadora de um polipeptídeo podem criar mutações de deslocamento de fase, de *nonsense*, ou *missense* nesta seqüência codificadora e deste modo alterar o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo após tais alterações.

(2) Identidade de polipeptídeos é calculada pela multiplicação do número total de aminoácidos pelo número inteiro definindo a identidade percentual dividida por 100 e então subtração daquele produto de dito número total de aminoácidos, ou:

$$na \leq xa - (xa \bullet y)$$

sendo que na é o número de alterações de aminoácido, xa é o número total de aminoácidos na seqüência, y é 0,95 para 95%, 0,97 para 97% ou 1,00 para 100%, e \bullet é o símbolo para o operador de multiplicação, e sendo

que qualquer produto não-inteiro de xa e y é arredondado para baixo para o número inteiro mais próximo antes de sua subtração de xa .

O termo “Variante(s)” como aqui usado, refere-se a um polinucleotídeo ou polipeptídeo que difere de um polinucleotídeo ou polipeptídeo de referência respectivamente, mas mantém propriedades essenciais. Uma variante típica de um polinucleotídeo difere em sequência de nucleotídeos do outro polinucleotídeo de referência. Mudanças na sequência de nucleotídeos da variante podem ou não alterar a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo de referência. Mudanças de nucleotídeo podem resultar em substituições, adições, deleções de aminoácido, proteínas de fusão e truncamentos no polipeptídeo codificado pela sequência de referência, como discutido abaixo. Uma variante típica de um polipeptídeo difere em sequência de aminoácidos do outro polipeptídeo de referência. Geralmente, diferenças são limitadas de modo que as sequências do polipeptídeo de referência e da variante sejam aproximadamente similares no total e, em muitas regiões, idênticas. Uma variante e polipeptídeo de referência podem diferir em sequência de aminoácidos por uma ou mais substituições, adições, deleções em qualquer combinação. Um resíduo de aminoácido substituído ou inserido pode ou não ser um codificado pelo código genético. É bem reconhecido na técnica que certas substituições de aminoácido são consideradas como sendo “conservativas”. Aminoácidos são divididos em grupos baseados em propriedades de cadeia lateral comuns e substituições dentro de grupos que mantêm toda ou substancialmente toda a afinidade de ligação do anticorpo da invenção ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo são consideradas como substituições conservativas, veja tabela abaixo:

Cadeia Lateral	Membros
Hidrofóbica	Met, Ala, Val, Leu, Ile
Hidrofílica Neutra	Cys, Ser, Thr
Ácida	Asp, Glu
Básica	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Resíduos que influenciam a orientação da cadeia	Gly, Pro
Aromática	Trp, Tyr, Phe

Em alguns aspectos da invenção variantes nas quais vários, por exemplo 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 resíduos de aminoácido ou 1 resíduo de aminoácido estão substituídos, deletados, ou adicionados em qualquer combinação podem estar incluídos. Uma variante de um polinucleotídeo ou polipeptídeo pode ser uma naturalmente ocorrente tal como uma variante alélica, ou pode ser uma variante que é desconhecida em ocorrer naturalmente. Variantes não-naturalmente ocorrentes de polinucleotídeos e polipeptídeos podem ser preparadas por técnicas de mutagênese, por síntese direta, e por outros métodos recombinantes conhecidos por técnicos experientes.

“Isolado” significa alterado “pela mão do homem” de seu estado natural, tendo sido modificado ou removido de seu ambiente original, ou ambos. Por exemplo, um polinucleotídeo ou um polipeptídeo naturalmente presente em um organismo vivo está não “isolado”, mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo separado dos materiais coexistentes de seu estado natural está “isolado”, incluindo mas não limitado a quando tal polinucleotídeo ou polipeptídeo é introduzido de volta em uma célula, até mesmo se a célula for da mesma espécie ou do mesmo tipo da qual o polinucleotídeo ou polipeptídeo foi separado.

Em todo o presente relatório descritivo e nas reivindicações acompanhantes o termo “compreendendo” e “compreende” incorpora “consistindo de e “consiste de”. Isto é, estas palavras são intencionadas para cobrirem a inclusão possível de outros elementos ou números inteiros não especificamente citados, onde o contexto permite.

O termo “perfil de glicosilação” como aqui usado refere-se aos níveis de glicosilação em uma população de anticorpos.

O termo “especificamente se liga em” como usado em todo o presente relatório descritivo em relação aos anticorpos e seus fragmentos de ligante de antígeno da invenção significa que o anticorpo se liga em IGF-1R

de humano (hIGF-1R) com nenhuma ligação ou ligação insignificante em outras proteínas de humano. O termo contudo não exclui o fato de que os anticorpos da invenção também podem reagir cruzadamente com outras formas de IGF-1R, por exemplo IGF-1R de primata.

5 O termo “neutraliza” como usado em todo o presente relatório descritivo em relação aos anticorpos e seus fragmentos de ligante de antígeno da invenção significa que a atividade biológica de IGF-1R é reduzida na presença dos anticorpos e seus fragmentos de ligante de antígeno da presente invenção em comparação com a atividade de IGF-1R na ausência de tais
10 anticorpos e seus fragmentos de ligante de antígeno. Neutralização pode ser devido mas não é limitada a um ou mais de bloqueio de ligação de ligante, prevenção de ativação do receptor pelo ligante, regulação negativa do IGF-1R ou afetação da funcionalidade efetora. Níveis de neutralização podem ser medidos em várias maneiras, por exemplo pelo uso dos ensaios como
15 mostrados nos exemplos abaixo, por exemplo em um ensaio de proliferação de célula LISN que pode ser realizado por exemplo como descrito em Exemplo 23. A neutralização de IGF-1R neste ensaio é medida por avaliação da proliferação de célula de tumor decrescida na presença de anticorpo neutralizador.

20 Níveis de neutralização também podem ser medidos, por exemplo em um ensaio de fosforilação de receptor que pode ser realizado por exemplo como descrito em Exemplo 13. A neutralização de IGF-1R neste ensaio é medida pela avaliação da inibição de fosforilação de receptor na presença de anticorpo neutralizador.

25 Se um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo é capaz de neutralização então isto é indicativo de inibição da interação entre proteínas ligantes de IGF-1R de humano por exemplo hIGF-I ou hIGF-II e seu receptor. Anticorpos que são considerados em ter atividade neutralizadora contra IGF-1R de humano teriam uma IC_{50} menor do que 10

microgramas/ml, ou menor do que 5 microgramas/ml, ou menor do que 2 microgramas/ml, ou menor do que 1 micrograma/ml no ensaio de proliferação de célula LISN ou ensaio de fosforilação de receptor como mostrado em Exemplos 23 e Exemplo 13 respectivamente.

5 Em um aspecto alternativo da presente invenção são fornecidos anticorpos ou seus fragmentos de ligante de antígeno que têm atividade neutralizadora equivalente a dos anticorpos aqui exemplificados, por exemplo anticorpos que retêm atividade neutralizadora de H0L0 e H0L0 IgG1m(AA) e H1L0 e H10L0 IgG1m(AA) no ensaio de proliferação de célula
10 LISN ou ensaio de fosforilação de receptor como mostrado em Exemplos 23 e 13 respectivamente.

 Em todo este relatório descritivo, resíduos de aminoácido em seqüências de anticorpo são numerados de acordo com o esquema de Kabat. Similarmente, os termos “CDR”, “CDRL1”, “CDRL2”, “CDRL3”,
15 “CDRH1”, “CDRH2”, “CDRH3” seguem o sistema de numeração de Kabat como mostrado em Kabat et al.; “Sequences of proteins of Immunological Interest” NIH, 1987. Será evidente para aquelas pessoas experientes na técnica que há definições alternativas de seqüências de CDR tais como por exemplo aquelas mostradas em Chothia et al. (1989).

20 Será evidente para aquelas pessoas experientes na técnica que o termo “derivado” é intencionado para definir não apenas a fonte no sentido de ela ser de origem física para o material mas também para definir material que é estruturalmente idêntico (em termos de seqüência de aminoácidos primária) ao material mas que não se origina da fonte de referência. Assim
25 “resíduos” encontrados no anticorpo doador do qual CDRH3 é derivada não precisam necessariamente terem sido purificados do anticorpo doador.

 O termo “estabilidade” como usado em todo o presente relatório descritivo em relação aos anticorpos e seus fragmentos de ligante de antígeno da invenção significa que a atividade do anticorpo ou fragmento de

ligante de antígeno quando determinada por ELISA de ligação direta é comparável 12 dias após incubação em soro com valores iniciais de EC-50 a - 20°C, 4°C ou 37°C.

5 Um “anticorpo quimérico” refere-se a um tipo de anticorpo engenhado que contém um domínio variável naturalmente ocorrente (cadeia leve e cadeias pesadas) derivado de um anticorpo doador em associação com regiões constantes de cadeias leve e pesada derivadas de um anticorpoceptor.

10 Um “anticorpo humanizado” refere-se a um tipo de anticorpo engenhado tendo suas CDRs derivadas de uma imunoglobulina doadora de não-humano, as partes derivadas de imunoglobulina restantes da molécula sendo derivadas de uma (ou mais) imunoglobulina(s) de humano. Em adição, resíduos de suporte de molde podem ser alterados para preservar a afinidade de ligação (veja, e.g., Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032
15 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)). Um anticorpoceptor de humano adequado pode ser um selecionado de um banco de dados convencional, e.g., o banco de dados KABAT®, banco de dados Los Alamos, e banco de dados Swiss Protein, por homologia com as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do anticorpo doador. Um anticorpo de humano
20 caracterizado por uma homologia com as regiões de molde do anticorpo doados (em uma base de aminoácido) pode ser adequado para fornecer uma região constante de cadeia pesada e/ou uma região de molde variável de cadeia pesada para inserção das CDRs de doador. Um anticorpoceptor adequado capaz de doar regiões de molde variáveis ou constantes de cadeia
25 leve pode ser selecionado em uma maneira similar. Deve ser notado que não é exigido que as cadeias leve e pesada do anticorpoceptor se originem do mesmo anticorpoceptor. A técnica anterior descreve várias maneiras de produzir tais anticorpos humanizados - veja por exemplo EP-A-0239400 e EP-A-054951.

O termo “anticorpo doador” refere-se a um anticorpo (monoclonal, e/ou recombinante) que contribui com as seqüências de aminoácidos de seus domínios variáveis, CDRs, ou outros fragmentos funcionais ou análogos dos mesmos para um primeiro parceiro de imunoglobulina, de modo a fornecer a região codificadora de imunoglobulina alterada e resultando o anticorpo alterado expressado com a especificidade antigênica e atividade neutralizadora características do anticorpo doador.

O termo “anticorpo acceptor” refere-se a um anticorpo (monoclonal e/ou recombinante) heterólogo ao anticorpo doador, que contribui com todas (ou qualquer porção, mas preferivelmente todas) as seqüências de aminoácidos codificadoras de suas regiões de molde de cadeia pesada e/ou leve e/ou suas regiões constantes de cadeia pesada e/ou leve com o primeiro parceiro de imunoglobulina. O anticorpo de humano é o anticorpo acceptor.

“CDRs” são definidas com as seqüências de aminoácidos de região determinante de complementaridade de um anticorpo que são domínios hipervariáveis de cadeias pesada e leve de imunoglobulina. Veja, e.g., Kabat et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Há três CDRs de cadeia pesada e três CDRs de cadeia leve (ou regiões de CDR) na porção variável de uma imunoglobulina. Assim, “CDRs” como aqui usado refere-se a todas as três CDRs de cadeia pesada, ou todas as três CDRs de cadeia leve (ou ambas todas as CDRs de cadeia pesada e todas as CDRs de cadeia leve, se apropriadas). A estrutura e o dobramento de proteína do anticorpo podem significar que outros resíduos são considerados parte da região ligante de antígeno e seriam entendidas em serem assim por uma pessoa experiente. Veja por exemplo Chothia et al., (1989) “Conformations of immunoglobulin hypervariable domains”; Nature 342, p877-883.

CDRs fornecem a maioria dos resíduos de contato para a ligação do anticorpo no antígeno ou epitopo. CDRs de interesse nesta invenção são derivadas de seqüências de cadeias leve e pesada variáveis doadoras de anticorpo, e incluem análogos das CDRs naturalmente ocorrentes, cujos análogos também compartilham ou retêm a mesma especificidade de ligação de antígeno e/ou capacidade de neutralização que as do anticorpo doador do qual foram derivadas.

Os termos “V_H” e “V_L” são aqui usados para se referirem ao domínio variável de cadeia pesada e ao domínio variável de cadeia leve respectivamente de um anticorpo.

O termo “Função Efetora” como aqui usado refere-se a uma ou mais respostas mediadas por Atividade Citotóxica Mediada por Célula Dependente de Anticorpo (ADCC) e Atividade Citotóxica Dependente de Complemento (CDC), fagocitose mediada por Fc e reciclo de anticorpo via o receptor FcRn. Acredita-se que a interação entre a região constante de um anticorpo e vários receptores Fc (FcR) medeiam as funções efetoras do anticorpo. Efeitos biológicos significativos podem ser uma consequência de funcionalidade efetora, em particular, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), fixação de complemento (citotoxicidade dependente de complemento ou CDC), fagocitose (fagocitose mediada por célula dependente de anticorpo ou ADCP) e depuração/meia-vida de do anticorpo. Costumeiramente, a capacidade para mediar função efetora exige ligação do anticorpo em um antígeno e nem todos os anticorpos mediarão cada função efetora.

Função efetora pode ser medida em numerosas maneiras incluindo por exemplo via ligação do FcγRIII em células Matadoras Naturais ou via FcγRI em monócitos/macrófagos para medir função efetora de ADCC. Por exemplo o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno da presente invenção tem uma função efetora de ADCC aumentada quando medida contra

o anticorpo de tipo selvagem equivalente ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo em um ensaio de célula Matadora Natural. Exemplos de tais ensaios podem ser encontrados em Shields *et al.*, 2001 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, p6591-6604; Chappel *et al.*, 1993 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 268, p25124-25131; Lazar *et al.*, 2006 *PNAS*, 103; 4005-4010.

Exemplos de ensaios para determinar a função de CDC incluem aqueles descritos em 1995 *J Imm Meth* 184:29-38.

Várias modificações na região constante de cadeia pesada de anticorpos podem ser realizadas dependendo da propriedade efetora desejada. Regiões constantes de humano que essencialmente são faltantes das funções de a) ativação de complemento pela via clássica; e b) mediação de citotoxicidade celular dependente de anticorpo incluem a região constante de IgG4 e a região constante de IgG2. Tem sido separadamente descrito que as regiões constantes de IgG1 contendo mutações específicas reduzem a ligação em receptores Fc e portanto reduzem ADCC e CDC (Duncan *et al.* *Nature* 1988, 332; 563-564; Lund *et al.* *J. Immunol.* 1991, 147; 2657-2662; Chappel *et al.* *PNAS* 1991, 88; 9036-9040; Burton e Woof, *Adv. Immunol.* 1992, 51;1-84; Morgan *et al.*, *Immunology* 1995, 86; 319-324; Hezareh *et al.*, *J. Virol.* 2001, 75 (24); 12161-12168). Também tem sido descrito que regiões constantes de IgG1 de humano contendo mutações específicas ou glicosilação alterada em resíduo Asn297 intensificam a ligação em receptores Fc. Também tem sido mostrado que estas intensificam ADCC e CDC, em alguns casos (Lazar *et al.* *PNAS* 2006, 103; 4005-4010; Shields *et al.* *J Biol Chem* 2001, 276; 6591-6604; Nechansky *et al.* *Mol Immunol*, 2007, 44; 1815-1817).

Para anticorpos IgG, funcionalidades efetoras incluindo ADCC e ADCP são mediadas pela interação da região constante de cadeia pesada com uma família de receptores Fcγ presentes sobre a superfície de células imunes. Em humanos estes incluem FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII

(CD16). Interação entre o anticorpo ligado em antígeno e a formação do complexo Fc/Fc γ induz uma variedade de efeitos incluindo citotoxicidade, ativação de célula imune, fagocitose e liberação de citocinas inflamatórias. É sabido que substituições específicas na região constante (incluindo S239D/I332E) aumentam a afinidade da região constante de cadeia pesada por certos receptores Fc, aperfeiçoando assim a funcionalidade efetora do anticorpo (Lazar et al. PNAS 2006).

1. Estruturas de anticorpo

1.1 Anticorpos intactos

Anticorpos intactos incluem glicoproteínas heteromultiméricas compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. À parte de IgM, anticorpos intactos são costumeiramente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150Kda, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Tipicamente, cada cadeia leve está ligada em uma cadeia pesada por uma ligação de dissulfeto covalente enquanto que varia o número de ligações de dissulfeto entre as cadeias pesadas de isótipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve também tem pontes de dissulfeto intracadeias. Cada cadeia pesada tem em uma extremidade um domínio variável (V_H) seguido por numerosas regiões constantes (CH_1 , CH_2 , CH_3). Cada cadeia leve tem um domínio variável (V_L) e uma região constante em sua outra extremidade; a região constante de cadeia pesada da cadeia leve está alinhada com a primeira região constante da cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. As cadeias leves de anticorpos da maioria das espécies de vertebrado podem ser designadas para um de dois tipos chamados de Kappa e Lambda baseado na sequência de aminoácidos da região constante. Dependendo da sequência de aminoácidos da região constante de cadeia pesada de suas cadeias pesadas, anticorpos de humano podem ser designados para cinco classes diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e

IgM. IgG e IgA podem ser adicionalmente subdivididos em subclasses, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Variantes de espécie existem com camundongo e rato tendo pelo menos IgG2a, IgG2b. O domínio variável do anticorpo concede especificidade de ligação ao anticorpo com certas regiões exibindo variabilidade particular chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDRs). As porções mais conservadas do domínio variável são chamadas de regiões de Molde (FR). Os domínios variáveis de cadeias pesada e leve intactas compreendem, cada um, quatro FR conectadas por três CDRs. As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas em proximidade íntima pelas regiões FR e com as CDRs da outra cadeia contribuem para a formação do sítio de ligação de antígeno de anticorpos. As regiões constantes não estão diretamente envolvidas na ligação do anticorpo no antígeno mas exibem várias funções efectoras tais como participação em citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose via ligação em receptor Fc γ , taxa de depuração / meia-vida via receptor Fc neonatal (FcRn) e citotoxicidade dependente de complemento via o componente C1q da cascata de complemento.

1.1.2 Anticorpos de humano

Anticorpos de humano podem ser produzidos por numerosos métodos conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica. Anticorpos de humano podem ser preparados pelo método de hibridoma usando linhagens de célula de hetero-Mieloma de camundongo-humano ou de Mieloma de humano, veja Kozbor J.Immunol 133, 3001, (1984) e Brodeur Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Métodos alternativos incluem o uso de bibliotecas de fago ou camundongos transgênicos ambos os quais utilizam repertórios de domínio variável de humano (veja Winter G, (1994), Annu.Rev.Immunol 12,433-455, Green LL (1999), J.Immunol.methods 231, 11-23).

Estão agora disponíveis várias cepas de camundongos

transgênicos sendo que seus loci de imunoglobulina de camundongo têm sido substituídos por segmentos de gene de imunoglobulina de humano (veja Tomizuka K, (2000) PNAS 97,722-727; Fishwild D.M (1996) Nature Biotechnol. 14,845-851, Mendez MJ, 1997, Nature Genetics, 15,146-156).

- 5 Sob desafio de antígeno tais camundongos são capazes de produzir um repertório de anticorpos de humano do qual anticorpos de interesse podem ser selecionados. De nota particular é o sistema TrimerTM (veja Eren Retal, (1998) Immunology 93:154-161) onde linfócitos de humano são transplantados em camundongos irradiados, o Sistema de Anticorpo de
- 10 Linfócito Selecionado (SLAM, veja Babcook et al, PNAS (1996) 93:7843-7848) onde linfócitos de humano (ou outra espécie) são efetivamente determinados através de um procedimento de geração reunida massiva de anticorpo in vitro seguido por procedimento deconvulso, de diluição limitada e seleção e o Xenomouse IITM (Abgenix Inc). Uma abordagem
- 15 alternativa está disponível na Morphotek Inc usando a tecnologia MorphodomaTM.

- Tecnologia de exibição de fago pode ser usada para produzir anticorpos de humano (e seus fragmentos), veja McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) e Griffiths AD et al. (1994) EMBO 13:3245-3260. De acordo
- 20 com esta técnica genes de domínio variável de anticorpo são clonados em matriz em uma capa quer maior quer menor de gene de proteína de um bacteriófago filamentosos tal como M13 ou fd e exibidos (costumeiramente com o auxílio de um fago auxiliador) como seus fragmentos de ligante de antígeno funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Seleções baseadas
- 25 nas propriedades funcionais do anticorpo resultam em seleção do gene codificador do anticorpo exibindo aquelas propriedades. A técnica de exibição de fago pode ser usada para selecionar anticorpos específicos para antígeno de bibliotecas preparadas a partir de células B de humano obtidas de indivíduos afligidos com uma doença ou um distúrbio descrita(o) acima ou

alternativamente de doadores humanos não-imunizados (veja Marks; J.Mol.Bio. 222,581-597, 1991). Onde um anticorpo intacto de humano é desejado compreendendo um domínio constante é necessário reclonar o fragmento derivado exibido de fago em um vetor de expressão de mamífero compreendendo as regiões constantes desejadas e estabelecer as linhagens celulares de expressão estável.

A técnica de maturação de afinidade (Marks; Bio/technol 10,779-783 (1992)) pode ser usada para melhorar a afinidade de ligação sendo que a afinidade do anticorpo primário de humano é melhorada por substituição seqüencial dos domínios de variáveis de cadeias H e L por variantes naturalmente ocorrentes e seleção baseada nas afinidades de ligação melhoradas. Variantes desta técnica tal como “impressão de epítipo” também estão disponíveis, veja WO 93/06213. Veja também Waterhouse; Nucl.Acids Res 21, 2265-2266 (1993).

1.2 Anticorpos quiméricos e humanizados

O uso de anticorpos intactos de não-humano no tratamento de doenças ou distúrbios de humano traz consigo o potencial para os problemas de imunogenicidade agora bem estabelecidos, isto é o sistema imune do paciente pode reconhecer o anticorpo intacto de não-humano como não-próprio e montar uma resposta neutralizadora. Isto é particularmente evidente sob administração múltipla do anticorpo de não-humano a um paciente humano. Várias técnicas têm sido desenvolvidas no decorrer dos anos para suplantar estes problemas e geralmente envolvem redução de uma composição de seqüências de aminoácidos de não-humano no anticorpo intacto enquanto se retém a facilidade relativa na obtenção de anticorpos de não-humano a partir de um animal imunizado e.g. camundongo, rato ou coelho. Amplamente duas abordagens têm sido usadas para realizar isto. A primeira é de os anticorpos quiméricos, que geralmente compreendem um domínio variável de não-humano (e.g. roedor tal como camundongo)

fusionado em uma região constante de humano. Devido ao fato de o sítio de ligação em antígeno de um anticorpo estar localizado dentro dos domínios variáveis, o anticorpo quimérico retém sua afinidade de ligação pelo antígeno mas adquire as funções efetoras da região constante de humano e é portanto capaz de realizar funções efetoras tais como descritas supra. Anticorpos quiméricos são tipicamente produzidos usando métodos de DNA recombinante. DNA codificador dos anticorpos (e.g. cDNA) é isolado e seqüenciado usando procedimentos convencionais (e.g. pelo uso de sondas de oligonucleotídeo que são capazes de ligação especificamente nos genes codificadores das cadeias H e L do anticorpo da invenção. Células de hibridoma servem como uma fonte típica de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA é posicionado em vetores de expressão que são então transferidos para dentro de células hospedeiras tais como *E. coli*, células COS, célula CHO ou células de Mieloma que não produzem de outra maneira proteína imunoglobulina para obter síntese do anticorpo. O DNA pode ser modificado por substituição das correspondentes regiões constantes H e L de não-humano (e.g. murina) por seqüência codificadora de cadeias L e H de humano, veja e.g. Morrison; PNAS 81, 6851 (1984).

A segunda abordagem envolve a geração de anticorpos humanizados sendo que o teor de não-humano do anticorpo é reduzido por humanização dos domínios variáveis. Duas técnicas para humanização têm ganho popularidade. A primeira é humanização por enxerto de CDR. CDRs desenvolvem alças fechadas na terminação-N do anticorpo onde formam uma superfície montada em uma armação fornecida pelas regiões de molde. Especificidade de ligação em antígeno do anticorpo é principalmente definida pela topografia e pelas características químicas de sua superfície de CDR. Estas feições são por sua vez determinadas pela conformação das CDRs individuais, pela disposição relativa das CDRs, e pelas natureza e disposição das cadeias laterais dos resíduos compreendendo as CDRs. Um decréscimo

grande em imunogenicidade pode ser alcançado por enxerto apenas das CDRs de anticorpos de não-humano (e.g. murino) (anticorpos “doadores”) em molde de humano (“molde acceptor”) e regiões constantes (veja Jones et al. (1986) Nature 321,522-525 e Verhoeyen M et al. (1988) Science 239, 1534-1536).

5 Contudo, enxerto de CDR por si não pode resultar na retenção completa de propriedades de ligação em antígeno e é freqüentemente verificado que alguns resíduos de molde (algumas vezes chamados de “retro-mutações”) do anticorpo doador necessitam ser preservados na molécula humanizada se afinidade de ligação em antígeno significativa for para ser recuperada (veja 10 Queen C et al. (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M et al. (1991) Nature 351, 501-502). Neste caso, domínios variáveis de humano mostrando a mais elevada homologia de seqüência com o anticorpo doador de não-humano são escolhidos de um banco de dados com o propósito de fornecer um molde de humano (FR). A seleção de FRs de humano pode ser feita de anticorpos quer 15 de humano individuais quer de consenso de humano. Onde necessário resíduos chave do anticorpo doador são substituídos no molde acceptor de humano para preservar as conformações de CDR. Modelagem por computador do anticorpo pode ser usada para ajudar a identificar tais resíduos estruturalmente importantes, veja W099/48523.

20 Alternativamente, humanização pode ser alcançada por um processo de “*veneering*” (modificação superficial). Uma análise estatística de domínios variáveis de cadeias leve e pesada de imunoglobulina murina e de humano únicos revelou que os padrões precisos de resíduos expostos são diferentes em anticorpos murino e de humano, e as posições de superfície 25 mais individuais têm uma preferência forte por um número pequeno de resíduos diferentes (veja Padlan E.A. et al; (1991) Mol.Immunol, 28, 489-498 e Pedersen J.T. et al. (1994) J.Mol.Biol. 235; 959-973).

Portanto é possível reduzir a imunogenicidade de um Fv de não-humano pela substituição de resíduos expostos em suas regiões de molde

que diferem daqueles costumeiramente encontrados em anticorpos de humano. Devido ao fato de a antigenicidade de proteína poder estar correlacionada com acessibilidade de superfície, substituição dos resíduos de superfície pode ser suficiente para tornar o domínio variável de camundongo “invisível” para o sistema imune de humano (veja também Mark G.E. et al. (1994) em Handbook of Experimental Pharmacology vol, 113: “The pharmacology of monoclonal antibodies”, Springer-Verlag, pp105-134). Este procedimento de humanização é chamado de “*veneering*” (modificação superficial) porque apenas a superfície do anticorpo é alterada, os resíduos de suporte permanecem inalterados.

1.3 Anticorpos biespecíficos

Um anticorpo biespecífico é um anticorpo tendo especificidades e ligação por pelo menos dois epitopos diferentes. Métodos de preparação de tais anticorpos são conhecidos na técnica. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia L - cadeia H de imunoglobulina, onde as duas cadeias H têm especificidades de ligação diferentes, veja Millstein et al., Nature 305 537-539 (1983), WO93/08829 e Traunecker et al. EMBO, 10, 1991, 3655-3659. Devido ao fato da seleção aleatória das cadeias H e L, é produzida uma mistura potencial de dez estruturas de anticorpo diferentes das quais apenas uma delas tem a especificidade de ligação desejada. Uma abordagem alternativa envolve a fusão dos domínios variáveis com as especificidades de ligação desejadas na região constante de cadeia pesada compreendendo pelo menos parte da região de dobradiça, as regiões CH2 e CH3. Em uma modalidade a região CH1 contendo o sítio necessário para a ligação de cadeia leve está presente em pelo menos uma das fusões. DNA codificador destas fusões, e se desejado a cadeia L são inseridos em vetores de expressão separados e então são co-transfectados em um organismo hospedeiro adequado. Não obstante é possível inserir as seqüências codificadoras de duas

ou de todas as três seqüências em um vetor de expressão. Em uma abordagem, o anticorpo biespecífico é composto de uma cadeia H com uma primeira especificidade de ligação e um braço e uma par de cadeias H-L, fornecendo uma segunda especificidade de ligação no outro braço, veja
5 WO94/04690. Também veja Suresh et al. Methods in Enzymology 121, 210, 1986.

Em uma modalidade da invenção é fornecido um anticorpo biespecífico sendo que pelo menos uma especificidade de ligação de dito anticorpo é para hLGF-1R, e dito anticorpo neutraliza a atividade de hLGF-1R.
10 Tais anticorpos podem adicionalmente compreender uma região constante de humano do isótipo IgG, e.g. IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Anticorpos da presente invenção também podem ser multiespecíficos, por exemplo anticorpos multiespecíficos formados pela montagem de numerosos fragmentos de ligante de antígeno.

15 1.4 Fragmentos de ligante de antígeno

Tais fragmentos de ligante de antígeno compreendem uma seqüência variável de cadeia leve ou pesada parcial (e.g., deleções menores na terminação amino ou carboxila do domínio variável de imunoglobulina) que retém a mesma especificidade de antígeno ou a mesma capacidade de
20 neutralização similar que a do anticorpo do qual o fragmento foi derivado.

Em certas modalidades da invenção são fornecidos fragmentos de ligante de antígeno que neutralizam a atividade de hLGF-1R. Tais fragmentos podem se fragmentos funcionais ligantes de antígeno de anticorpos intactos e/ou humanizados e/ou quiméricos tais como fragmentos
25 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv dos anticorpos descritos supra. Tradicionalmente tais fragmentos são produzidos por digestão proteolítica de anticorpos intactos por e.g. digestão por papaína (veja por exemplo, WO 94/29348) mas podem ser produzidos diretamente de células hospedeiras recombinantemente transformadas. Para a produção de ScFv, veja Bird et al.; (1988) Science, 242,

423-426. Em adição, fragmentos de ligante de antígeno podem ser produzidos usando uma variedade de técnicas de engenharia descritas abaixo.

Fragmentos Fv parecem ter energia de interação de suas duas cadeias mais baixa do que os fragmentos Fab. Para estabilizar a associação dos domínios V_H e V_L , têm sido ligados com peptídeos (Bird et al., (1988) Science 242, 423-426, Huston et al., PNAS, 85, 5879-5883), pontes de dissulfeto (Glockshuber et al., (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367) e mutações “knob in hole” (Zhu et al. (1997), Protein Sci., 6, 781-788). Fragmentos ScFv podem ser produzidos por métodos bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica veja Whitlow et al. (1991) Methods Companion Methods Enzymol, 2, 97-105 e Huston et al. (1993) Int.Rev.Immunol 10, 195-217. ScFv pode ser produzido em células bacterianas tal como E. coli mas são mais preferivelmente produzidos em células eucarióticas. Uma desvantagem de ScFv é a monovalência do produto, que impede uma avidéz aumentada devido à ligação polivalente, e sua meia-vida curta. Tentativas para suplantar estes problemas incluem (ScFv')₂ bivalente produzido a partir de ScFV contendo uma cisteína C terminal adicional por copulação química (Adams et al. (1993) Can.Res 53, 4026-4034 e McCartney et al. (1995) Protein Eng. 8, 301-314) ou por dimerização espontânea sítio-específica de ScFv contendo um resíduo de cisteína C terminal não pareado (veja Kipriyanov et al. (1995) Cell. Biophys 26, 187-204).

Alternativamente, ScFv pode ser forçado a formar multímeros por encurtamento do ligante de peptídeo para 3 a 12 resíduos para formar “diacorpos”, veja Holliger et al. PNAS (1993), 90, 6444-6448. Redução do ligante ainda mais pode resultar em trímeros de ScFV (“triacorpos”, veja Kortt et al. (1997) Protein Eng, 10, 423-433) e tetrâmeros (“tetracorpos”, veja Le Gall et al. (1999) FEBS Lett, 453, 164-168). Construção de moléculas bivalentes de ScFV também pode ser realizada por fusão genética com

motivos de dimerização de proteína para formar “minianticorpos” (veja Pack et al. (1992) *Biochemistry* 31, 1579-1584) e “minicorpos” (veja Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56, 3055-3061). ScFv-Sc-Fv tandens ((ScFV)₂) também podem ser produzidos por ligação de duas unidades de ScFv por um terceiro

5 ligante peptídeo, veja Kurucz et al. (1995) *J. Immunol.* 154, 4576-4582. Diacorpos biespecíficos podem ser produzidos através da associação não-covalente de dois produtos de fusão de cadeia única consistindo de domínio V_H de um anticorpo conectado por um ligante curto no domínio V_L de outro anticorpo, veja Kipriyanov et al. (1998), *Int. J. Cancer* 77, 763-772. A estabilidade

10 de tais diacorpos biespecíficos pode ser aperfeiçoada pela introdução de pontes de dissulfeto ou mutações “knob in hole” como descrito supra ou pela formação de diacorpos de cadeia única (ScDb) sendo que dois fragmentos de ScFv híbridos são conectados através de um ligante peptídeo veja Kontermann et al. (1999) *J. Immunol. Methods* 226 179-188. Moléculas

15 biespecíficas tetravalentes estão disponíveis por e.g. fusão de um fragmento ScFv no domínio CH3 de uma molécula IgG ou em um fragmento Fab através da região de dobradiça veja Coloma et al. (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 159-163. Alternativamente, moléculas biespecíficas tetravalentes têm sido criadas pela fusão de diacorpos de cadeia única biespecíficos (veja Alt et al., (1999)

20 FEBS Lett 454, 90-94. Moléculas biespecíficas tetravalentes menores também podem ser formadas por dimerização quer de ScFv-ScFv tandems com um ligante contendo um motivo de hélice-alça-hélice (minianticorpos DiBi, veja Muller et al. (1998) FEBS Lett 432, 45-49) quer de uma molécula de cadeia única compreendendo quatro domínios variáveis (V_H e V_L) de anticorpo em

25 uma orientação prevenindo pareamento intramolecular (diacopo em tandem, veja Kipriyanov et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293, 41-56). Fragmentos biespecíficos F(ab')₂ podem ser criados por copulação química de fragmentos Fab' ou por heterodimerização através de zíperes de leucina (veja Shalaby et al., (1992) *J. Exp. Med.* 175, 217-225 e Kostelny et al. (1992), *J. Immunol.* 148,

1547-1553). A frase um “domínio variável único de imunoglobulina” refere-se a um domínio variável de anticorpo (V_H , V_{HH} , V_L) que especificamente se liga em um antígeno ou epitopo independentemente de um domínio ou região V diferente. Um domínio variável único de imunoglobulina pode estar

5 presente em um formato (e.g., homo- ou hetero-multímero) com outras regiões variáveis diferentes ou outros domínios variáveis onde as outras regiões ou os outros domínios não são exigidas(os) para ligação de antígeno pelo domínio variável de imunoglobulina único (*i.e.*, onde o domínio variável único de imunoglobulina se liga em antígeno independentemente dos

10 domínios variáveis adicionais).

Também estão disponíveis domínios V_H e V_L isolados (Domantis plc), veja US 6.248.516; US 6.291.158; US 6. 72.197 estes são conhecidos como anticorpos de domínio. Um “anticorpo de domínio” ou “dAb” é igual a um “domínio variável único de imunoglobulina” que é capaz

15 de se ligar em um antígeno como o termo é aqui usado. Um domínio variável único de imunoglobulina pode ser um domínio variável de anticorpo de humano, mas também inclui domínios variáveis de anticorpo único de outras espécies tal como roedor (por exemplo, como revelado em WO 00/29004, V_{HH} dAbs de Camelídeo e de lambaru (*nurse shark*). V_{HH} de Camelídeo são

20 polipeptídeos de domínio variável único de imunoglobulina que são derivados de espécies incluindo camelo, lhama, alpaca, dromedário e guanaco, que produzem anticorpos de cadeia pesada naturalmente destituídos de cadeias leves. Tais domínios V_{HH} podem ser humanizados de acordo com técnicas padrão disponíveis na técnica, e tais domínios ainda são considerados

25 “anticorpos de domínio” de acordo com a invenção. Como aqui usado “ V_H ” inclui domínios V_{HH} de Camelídeo.

Em uma modalidade é fornecido um fragmento de ligante de antígeno (e.g. ScFv, Fab, Fab', F(ab')₂) ou um fragmento engenhado ligante de antígeno como descrito supra que especificamente se liga em hLGF-1R

neutraliza a atividade de hIGF-1R. O fragmento de ligante de antígeno pode compreender uma ou mais das seguintes seqüências CDRH3 como mostrada em SEQ. ID. NO: 1, CDRH2 como mostrada em SEQ. ID. NO: 2, CDRH1 como mostrada em SEQ. ID. NO: 3, CDRL1 como mostrada em SEQ. ID. NO: 4, CDRL2 como mostrada em SEQ. ID. NO: 5, e CDRL3 como mostrada em SEQ. ID. NO: 6.

1.5 Anticorpos heteroconjugados

Anticorpos heteroconjugados também formam uma modalidade da presente invenção. anticorpos heteroconjugados são compostos de dois anticorpos covalentemente unidos formados usando quaisquer métodos de ligação cruzada convenientes. Veja, por exemplo, US 4.676.980. Adicionalmente, combinações de anticorpos e fragmentos de ligante de antígeno estão incluídas dentro da presente invenção por exemplo, um ou mais anticorpos de domínio e ou ScFv ligados em um anticorpo monoclonal.

1.6 Outras modificações

Acredita-se que a interação entre a região constante de um anticorpo e vários receptores Fc (FcγR) medeia as funções efetoras que incluem citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), fixação de complemento, fagocitose e meia-vida/depuração do anticorpo. Várias modificações na região constante de anticorpos da invenção podem ser realizadas dependendo da propriedade desejada. Por exemplo, mutações específicas na região constante para tornar não-lítico um anticorpo que sob outras condições é lítico, são detalhadas em EP 0629240B1 e EP 0307434B2 ou pode-se incorporar um epitopo de ligação de receptor de salvamento no anticorpo para aumentar a meia-vida em soro veja US 5.739.277. Há cinco receptores Fcγ de humano correntemente reconhecidos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa e FcRn neonatal. Shields et al., (2001) J.Biol.Chem 276, 6591-6604 demonstraram que um conjunto comum de resíduos de IgG1 está envolvido em ligação de todos FcγRs, enquanto que FcγRII e FcγRIII utilizam

sítios distintos fora deste conjunto comum. Um grupo de resíduos de IgG1 reduziu a ligação em todos FcγRs quando alterado para alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 e Pro-239. Todos estão no domínio IgG CH2 e agrupados próximos da união de dobradiça CH1 e CH2. Embora FcγRI utilize apenas o conjunto comum de resíduos de IgG1 para ligação, FcγRII e FcγRIII interagem com resíduos distintos em adição ao conjunto comum. Alteração de alguns resíduos reduziu ligação apenas em FcγRII (e.g. Arg-292) ou FcγRIII (e.g. Glu-293). Algumas variantes mostraram ligação aperfeiçoada em FcγRII ou FcγRIII mas não afetaram a ligação no outro receptor (e.g. Ser-267Ala aperfeiçoou a ligação em FcγRII mas ligação em FcγRIII não foi afetada). Outras variantes exibiram ligação aperfeiçoada em FcγRII ou FcγRIII com redução em ligação no outro receptor (e.g. Ser-298Ala aperfeiçoou ligação em FcγRIII e reduziu ligação em FcγRII). Para FcγRIIIa, as variantes de IgG1 de melhor ligação tinham substituições de alanina combinadas em Ser-298, Glu-333 e Lys-334. Acredita-se que o receptor neonatal FcRn está envolvido em ambos depuração de anticorpo e a transcitose através de tecidos (veja Junghans R.P (1997) *Immunol.Res* 16. 29-57 e Ghetie et al. (2000) *Annu.Rev.Immunol.* 18, 739-766). Resíduos de IgG1 de humano determinados em interação diretamente com FcRn de humano incluem Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435. Mudanças em qualquer uma destas posições descritas nesta seção podem permitir meia-vida em soro aumentada e/ou propriedades efetoras alteradas de anticorpos da invenção.

Outras modificações incluem variantes de glicosilação dos anticorpos da invenção. É sabido que glicosilação de anticorpos em posições conservadas em suas regiões constantes tem um efeito profundo sobre a função de anticorpo, particularmente funções efetoras tais como aquelas descritas acima, veja por exemplo, Boyd et al. (1996), *Mol. Immunol.* 32, 1311-1318. Variantes de glicosilação dos anticorpos ou seus fragmentos de

ligante de antígeno da presente invenção as quais um ou mais grupos carboidrato estão adicionados, substituídos, deletados ou modificados são contempladas. Introdução de um motivo de asparagina-X-serina ou asparagina-X-treonina cria um sítio potencial para ligação enzimática de grupos carboidrato e pode portanto ser usada para manipular a glicosilação de um anticorpo. Em Raju et al. (2001) *Biochemistry* 40, 8868-8876 a sialiação terminal de uma imunoadesina TNFR-IgG foi aumentada através de um processo de reglactosilação e/ou resialilação usando beta-1,4-galactosiltransferase e/ou alfa-2,3-sialiltransferase. Acredita-se que o aumento da sialilação terminal prolonga a meia-vida da imunoglobulina. Anticorpos, em comum com a maioria das glicoproteínas, são tipicamente produzidos como uma mistura de glicoformas. Esta mistura é particularmente evidente quando anticorpos são produzidos em células eucarióticas, particularmente células de mamífero. Uma variedade de métodos tem sido desenvolvida para manufaturar glicoformas definidas, veja Zhang et al. *Science* (2004), 303, 371, Sears et al., *Science*, (2001) 291, 2344, Wacker et al. (2002) *Science*, 298 1790, Davis et al. (2002) *Chem.Rev.* 102, 579, Hang et al. (2001) *Acc.Chem.Res* 34, 727. Portanto a invenção contempla uma pluralidade de anticorpos (monoclonais) (que talvez possam ser do isótipo IgG, e.g. IgG1) como aqui descrito compreendendo um número definido (e.g. 7 ou menos, por exemplo 5 ou menos tal como duas ou uma) glicoforma(s) de ditos anticorpos ou seus fragmentos de ligante de antígeno.

Outras modalidades da invenção incluem anticorpos da invenção ou seus fragmentos de ligante de antígeno copulados em um polímero não-proteínico tal como poli(etileno-glicol) (PEG), poli(propileno-glicol) ou polioxialquileno. Conjugação de proteínas em PEG é uma técnica estabelecida para prolongar a meia-vida de proteínas, bem como reduzir antigenicidade e imunogenicidade de proteínas. O uso de PEGuilação com estilos (linear ou ramificado) e pesos moleculares diferentes tem sido

investigado com anticorpos intactos bem como fragmentos Fab', veja Koumenis I.L. et al. (2000) Int.J.Pharmaceut. 198:83-95.

2. Métodos de produção

Anticorpos da invenção podem ser produzidos como uma
5 população policlonal mas são mais preferivelmente produzidos como uma
população monoclonal (isto é como uma população substancialmente
homogênea de anticorpos idênticos direcionados contra um sítio de ligação de
antígeno específico). Naturalmente será evidente para aquelas pessoas
experientes na técnica que uma população implica mais do que uma entidade
10 de anticorpo. Anticorpos da presente invenção podem ser produzidos em
organismos transgênicos tais como cabras (veja Pollock et al. (1999),
J.Immunol.Methods 231:147-157), galinhas (veja Morrow KJJ (2000)
Genet.Eng.News 20:1-55, camundongos (veja Pollock et al) ou plantas (veja
Doran PM, (2000) Curr.Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998),
15 Nat.Med. 4; 601-606, Baez J et al., BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E et
al; (2000) Plant Mol.Biol. 42:583-590). Anticorpos também podem ser
produzidos por síntese química. Contudo, anticorpos da invenção são
tipicamente produzidos usando tecnologia de cultura de célula recombinante
bem conhecida por aquelas pessoas experientes na técnica. Um
20 polinucleotídeo codificador do anticorpo é isolado e inserido em um vetor
replicável tal como um plasmídeo para clonagem (amplificação) ou expressão
adicional. Um sistema de expressão útil é um sistema de glutamato sintetase
(tal como vendido por Lonza Biologies), particularmente onde a célula
hospedeira é CHO ou NS0 (veja abaixo). Polinucleotídeo codificador do
25 anticorpo é prontamente isolado e seqüenciado usando procedimentos
convencionais (e.g. sondas de oligonucleotídeo). Vetores que podem ser
usados incluem plasmídeo, vírus, fago, transposons, minicromossomos dos
quais plasmídeos são uma modalidade típica. Geralmente tais vetores
adicionalmente incluem uma seqüência de sinal, uma origem de replicação,

um ou mais genes marcadores, um elemento intensificador, um promotor e seqüências de terminação de transcrição operacionalmente ligados no polinucleotídeo de cadeia leve e/ou pesada de modo a facilitar a expressão. Polinucleotídeo codificador das cadeias leve e pesada pode ser inserido em

5 vetores separados e transfectado para dentro da mesma célula hospedeira ou, se desejado ambas as cadeias leve e pesada podem ser inseridas no mesmo vetor para transfecção para dentro da célula hospedeira. Assim de acordo com um aspecto da presente invenção é fornecido um processo de construção de um vetor codificador de cadeias leve e/ou pesada de um anticorpo ou

10 fragmento de ligante de antígeno do mesmo da invenção, cujo método compreende inserção em um vetor, de um polinucleotídeo codificador de qualquer uma cadeia leve e/ou pesada de um anticorpo da invenção.

É conhecido por aquelas pessoas experientes na técnica que genes sintéticos, que codificam a mesma proteína como um gene de tipo

15 selvagem ou naturalmente ocorrente, podem ser planejados pela modificação dos códons que são usados no gene.

Estas técnicas de planejamento envolvem substituição daqueles códons em um gene que são raramente usados em genes de mamífero por códons que são mais freqüentemente usados para aquele

20 aminoácido em gene de mamífero. Este processo, chamado de otimização de códon, é usado com a intenção de que o nível total de proteína produzida pela célula hospedeira é maior quando transfectada com o gene de códon-otimizado em comparação com o nível quando transfectada com a seqüência de tipo selvagem. Vários métodos têm sido publicados (Nakamura et. al.,

25 Nucleic Acids Research 1996, 24: 214-215; W098/34640; W097/11086).

Freqüências de códon podem ser derivadas de fontes da literatura para genes elevadamente expressados de muitas espécies (veja e. g. Nakamura et al. Nucleic Acids Research 1996, 24 : 214-215). Tabelas de uso de códons para humanos também têm sido publicadas (WO2005025614).

Será imediatamente evidente para aquelas pessoas experientes na técnica que devido à redundância do código genético, polinucleotídeos alternativos àqueles aqui revelados (particularmente aqueles de códon-otimizado para expressão em uma dada célula hospedeira) também estão disponíveis que codificarão os polipeptídeos da invenção.

3.1 Seqüências de sinal

Anticorpos da presente invenção podem ser produzidos como uma proteína de fusão com uma seqüência de sinal heteróloga tendo um sítio de clivagem específico na terminação N da proteína madura. A seqüência de sinal deve ser reconhecida e processada pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas, a seqüência de sinal pode ser por exemplo uma fosfatase alcalina líder, penicilinase líder, ou enterotoxina II termicamente estável líder. Para secreção por levedura as seqüências de sinal podem ser por exemplo uma invertase líder de levedura, um fator líder ou fosfatase ácida líder veja e.g. WO90/13646. Em sistemas de célula de mamífero, líderes secretórios virais, tais como sinal gD do herpes simples e uma seqüência de sinal de imunoglobulina nativa podem ser adequadas. Tipicamente a seqüência de sinal está ligada em matriz de leitura no DNA codificador do anticorpo da invenção.

3.2 Origem de replicação

Origens de replicação são bem conhecidas na técnica com pBR322 adequada para a maioria das bactérias gram-negativas, plasmídeo 2 μ e várias origens virais tais como SV40, políoma, adenovírus, VSV ou BPV para a maioria das células de mamífero. Geralmente o componente origem de replicação não é necessário para vetores de expressão em mamífero mas o SV40 pode ser usado porque contém o promotor precoce.

3.3 Marcador de seleção

Genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) concedem resistência a antibióticos ou outras toxinas e.g. ampicilina,

neomicina, metotrexato ou tetraciclina ou (b) complementam deficiências auxotróficas ou fornecem nutrientes não disponíveis nos meios complexos. O esquema de seleção pode envolver parada do crescimento da célula hospedeira. Células, que têm sido bem sucedidamente transformadas com os genes codificadores do anticorpo da presente invenção, sobrevivem devido a e.g. resistência à droga concedida pelo marcador de seleção. Outro exemplo é o denominado marcador de seleção DHFR no qual transformantes são cultivados na presença de metotrexato. Em modalidades típicas, células são cultivadas na presença de quantidades crescentes de metotrexato para amplificar o número de cópias do gene exógeno de interesse. Células CHO são uma linhagem celular particularmente útil para a seleção de DHFR. Um outro exemplo é o sistema de expressão de glutamato sintetase (Lonza Biologies). Um gene de seleção adequado para uso em levedura é o gene *trp1*, veja Stinchcomb et al. Nature 282, 38, 1979.

3.4 Promotores

Promotores adequados para expressão de anticorpos da invenção estão operacionalmente ligados em DNA/polinucleotídeo codificador do anticorpo. Promotores para hospedeiros procarióticos incluem promotor *phoA*, sistemas de promotor de Beta-lactamase e lactose, fosfatase alcalina, triptofano e promotores híbridos tal como Tac. Promotores adequados para expressão em células de levedura incluem 3-fosfoglicerato quinase ou outras enzimas glicolíticas e.g. enolase, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, hexoquinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutoquinase, glicose 6 fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase e glicoquinase. Promotores de levedura induzíveis incluem álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, metalotioneína e enzimas responsáveis pelo metabolismo de nitrogênio ou pela utilização de maltose/galactose. Promotores para expressão em sistemas de célula de mamífero incluem promotores virais tais como políoma, epitélioma contagioso e adenovírus (e.g.

adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma de ave, citomegalovírus (em particular o promotor de gene precoce imediato), retrovírus, vírus de hepatite B, actina, promotor do vírus do sarcoma de rous (RSV) e o vírus 40 de Símio precoce ou tardio. Naturalmente a escolha do

5 promotor é baseada na compatibilidade adequada com a célula hospedeira usada para expressão. Em uma modalidade portanto é fornecido um primeiro plasmídeo compreendendo um promotor RSV e/ou SV40 e/ou CMV, DNA codificador de domínio variável de cadeia leve (V_L) da invenção, região κC junto com marcadores de seleção de resistência à neomicina e ampicilina e

10 um segundo plasmídeo compreendendo um promotor RSV ou SV40, DNA codificador do domínio variável de cadeia pesada (V_H) da invenção, DNA codificador da região constante $\gamma 1$, DHFR e marcadores de resistência à ampicilina.

3.5 Elemento intensificador

15 Onde apropriado, e.g. para expressão em eucariotos superiores, um elemento intensificador operacionalmente ligado no elemento promotor em um vetor pode ser usado. Sequências de intensificador de mamífero adequadas incluem elementos intensificadores de globina, elastase, albumina, fetoproteína e insulina. Alternativamente, pode-se usar um elemento

20 intensificador de um vírus de célula eucariótica tal como intensificador SV40 (a pb100-270), intensificador de promotor precoce de citomegalovírus, intensificador de polima, intensificador baculoviral ou locus IgG2a murino (veja WO04/009823). O intensificador pode estar localizado no vetor em um sítio a montante do promotor.

3.5.5 Sinais de poliadenilação

25 Em sistemas eucarióticos, sinais de poliadenilação estão operacionalmente ligados em DNA/polinucleotídeo codificador do anticorpo desta invenção. Tais sinais estão tipicamente localizados 3' da matriz de leitura aberta. Em sistemas de mamífero, exemplo não limitante inclui sinais

derivados de hormônios de crescimento, fator-1 alfa de alongamento e genes virais (eg SV40) ou repetições terminais longas retrovirais. Em sistemas de levedura exemplos não limitantes de sinais de terminação / poliadenilação incluem aqueles derivados dos genes de fosfoglicerato quinase (PGK) e álcool desidrogenase 1 (ADH). Em sistema de procarioto sinais de poliadenilação são tipicamente não exigidos e é em vez disso costumeiro o emprego de seqüências de terminador mais curtas e mais definidas. Naturalmente a escolha das seqüências de terminação / poliadenilação é baseada em compatibilidade adequada com a célula hospedeira usada para expressão.

10 3.6 Células hospedeiras

Células hospedeiras adequadas para vetores de expressão ou clonagem codificadores de anticorpos da invenção são células procarióticas, de levedura ou eucarióticas superiores. Células procarióticas adequadas incluem eubactéria e.g. enterobacteriaceae tais como *Escherichia* e.g. *E. coli* (por exemplo ATCC 31,446; 31,537; 27,325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella* *Proteus*, *Salmonella* e.g. *Salmonella typhimurium*, *Serratia* e.g. *Serratia marcescans* e *Shigella* bem como Bacilli tais como *B.subtilis* e *B.licheniformis* (veja DD 266.710), *Pseudomonas* tais como *P.aeruginosa* e *Streptomyces*. Das células hospedeiras de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (e.g. ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), *yarrowia* (EP402, 226), *Pichia Pastoris* (EP183, 070, veja também Peng et al. *J.Biotechnol.* 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP244, 234), *Penicillin*, *Tolypocladium* e hospedeiras *Aspergillus* tais como *A.nidulans* e *A.niger* também são contempladas.

25 Embora células hospedeiras procarióticas e de levedura sejam especificamente contempladas pela invenção, células hospedeiras da presente invenção são células eucarióticas superiores. Células eucarióticas superiores adequadas incluem células de mamífero tais como COS-1 (ATCC NO:CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), linhagem 293 de rim embrionário de

humano, células de rim de hamster bebê (BHK) (ATCC CRL. 1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC NO:CRL 1573), células de ovário de hamster chinês CHO (e.g. CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, linhagem celular DHFR-CHO como DG44 (veja Urlaubetal, (1986) Somatic Cell Mol.Genet,12, 555-556)), particularmente aquelas linhagens de célula CHO adaptadas para cultura em suspensão, células Sertoli de camundongo, células de rim de macaco, célula de rim de macaco verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células de rim de canino (ATCC CCL 34), células de pulmão de humano (ATCC CCL 75), células Hep G2 e Mieloma ou Linfoma e.g. NSO (veja US 5.807.715), Sp2/0,Y0.

Assim em uma modalidade da invenção é fornecida uma célula hospedeira estavelmente transformada compreendendo um vetor codificador de uma cadeia pesada e/ou cadeia leve do anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo como aqui descrito. Tais células hospedeiras compreendem um primeiro vetor codificador da cadeia leve e um segundo vetor codificador de dita cadeia pesada.

Fermentação bacteriana

Sistemas bacterianos são particularmente adequados para a expressão de fragmentos de ligante de antígeno. Tais fragmentos estão localizados intracelularmente ou dentro do periplasma. Proteínas periplásmicas INS0luble podem ser extraídas e redobradas para formar proteínas ativas de acordo com métodos conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica, veja Sanchez et al. (1999) J.Biotechnol. 72, 13-20 e Cupit PM et al. (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

3.7 Métodos de cultura de célula

Células hospedeiras transformadas com vetores codificadores de anticorpos da invenção ou seus fragmentos de ligante de antígeno podem ser cultivados por qualquer método conhecido por aquelas pessoas experientes na técnica. Células hospedeiras podem ser cultivadas em frascos

rotativos, garrafas giratórias sobre roletes ou sistemas de fibra oca, mas para produção em grande escala reatores de tanque agitado são usados para culturas em suspensão. Preferivelmente os tanques agitados estão adaptados para aeração usando e.g. borrifadores, defletores ou hélices de impulsão

5 cisalhamento baixo. Para colunas de borbulhadores e reatores aeróbicos aeração direta com bolhas de ar ou oxigênio pode ser usada. Onde as células hospedeiras são cultivadas em um meio de cultura livre de soro, o meio é suplementado com um agente protetor de célula tal como pluronic F-68 para ajudar a prevenir dano celular como um resultado do processo de aeração.

10 Dependendo das características da célula hospedeira, quer microsuportes podem ser usados como substratos de crescimento para linhagens de células dependentes de ancoragem quer as células podem ser adaptadas para a cultura em suspensão (que é típica). A cultura das células hospedeiras, particularmente células hospedeiras de invertebrado pode utilizar uma

15 variedade de modos operacionais tais como processamento por batelada alimentada, por batelada repetida (veja Drapeau et al. (1994) *Cytotechnology* 15: 103-109), processo em batelada prolongada ou cultura de perfusão. Embora células hospedeiras de mamífero recombinantemente transformadas possam ser cultivadas em meio contendo soro tal como soro fetal bovino

20 (FCS), por exemplo tais células hospedeiras são cultivadas em meio sintético livre de soro tal como revelado em Keen et al. (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, ou meio comercialmente disponível tal como ProCHO-CDM ou UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), suplementado onde necessário com uma fonte de energia tal como glicose e fatores de crescimento sintéticos tal como

25 insulina recombinante. A cultura livre de soro de células hospedeiras pode exigir que aquelas células sejam adaptadas para crescerem em condições livres de soro. Uma abordagem de adaptação é cultivar tais células hospedeiras em meio contendo soro e repetidamente trocar 80% do meio de cultura por meio livre de soro de modo que as células hospedeiras aprendam a

se adaptar em condições livres de soro (veja e.g. Scharfenberg K et al. (1995) em *Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. et al. eds), pp619-623, Kluwer Academic Publishers).

Anticorpos da invenção secretados para dentro do meio podem
5 ser recuperados e purificados usando uma variedade de técnicas para proporcionar um grau de purificação adequado para o uso intencionado. Por exemplo o uso de anticorpos da invenção para o tratamento de pacientes humanos tipicamente exige pelo menos 95% de pureza, mais tipicamente 98% ou 99% ou mais de pureza (comparado com o meio de cultura cru). Na
10 primeira situação, fragmentos celulares do meio de cultura são tipicamente removidos usando centrifugação seguida por uma etapa de clarificação do sobrenadante usando e.g. microfiltração, ultrafiltração e/ou filtração profunda. Está disponível uma variedade de outras técnicas tais como diálise e eletroforese em gel e técnicas cromatográficas tais como cromatografia em
15 hidróxi-apatita (HA), cromatografia de afinidade (opcionalmente envolvendo um sistema de etiquetagem de afinidade tal como poli-histidina) e/ou cromatografia por interação hidrofóbica (HIC, veja US 5.429.746). Em uma modalidade, os anticorpos da invenção, após várias etapas de clarificação, são capturados usando cromatografia de afinidade em Proteína A ou G seguida
20 por outras etapas de cromatografia tais como cromatografia HA e/ou de troca iônica, cromatografia de troca aniônica ou catiônica, cromatografia de exclusão de tamanho e precipitação por sulfato de amônio. Tipicamente, várias etapas de remoção de vírus também são utilizadas (e.g. nanofiltração usando e.g. um filtro DV-20). Após estas várias etapas, uma preparação
25 purificada (preferivelmente monoclonal) compreendendo pelo menos 75 mg/ml ou mais e.g. 100 mg/ml ou mais de anticorpo da invenção ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo é fornecida e portanto forma uma modalidade da invenção. Adequadamente tais preparações estão substancialmente livres de formas agregadas de anticorpos da invenção.

4. Composições farmacêuticas

Preparações purificadas de anticorpos da invenção (particularmente preparações monoclonais) como descritas supra, podem ser incorporadas em composições farmacêuticas para uso no tratamento de

5 doenças e distúrbios de humano tais como Artrite reumatóide, Psoríase ou Cânceres e.g; Leucemia Linfoblástica Aguda, Carcinoma Adrenocortical, Cânceres Relacionados com AIDS, Linfoma Relacionado com AIDS, Câncer Anal, Astrocitoma Cerebelar da Infância, Astrocitoma Cerebral da Infância, Câncer Colorretal, Carcinoma de Célula Basal, Câncer de Duto Biliar Extra-

10 hepático, Câncer de Bexiga, Osteossarcoma/Câncer Ósseo Histocitoma Fibroso Maligno, Tumores Cerebrais (e.g., Glioma de Tronco Cerebral, Astrocitoma Cerebelar, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Ependimoma, Meduloblastoma, Tumores Neuroectodermiais Primitivos Supratentoriais, Glioma Hipotalâmico e de Via Visual), Câncer de Mama,

15 Carcinóides/Adenocarcinomas Bronquiais, Linfoma de Burkitt, Tumor Carcinóide, Tumor Carcinóide Gastrointestinal, Carcinoma de Sítio Primário Desconhecido, Carcinoma de Sistema Nervoso Central Primário, Astrocitoma Cerebelar, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Câncer Cervical, Cânceres da Infância, Leucemia Linfocítica Crônica, Leucemia Mielógena Crônica,

20 Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Cólon, Câncer Colorretal, Linfoma de Célula-T Cutânea, Câncer Endometrial, Ependimoma, Câncer Esofágico, Família de Tumores de Ewing, Tumor de Célula Germinativa Extracranial, Tumor de Célula Germinativa Extragonadal, Câncer de Duto Biliar Extra-hepático, Câncer Ocular Melanoma Intraocular, Câncer Ocular

25 Retinoblastoma, Câncer de Vesícula Biliar, Câncer Gástrico (Estômago), Tumor Carcinóide Gastrointestinal, Tumores de Célula Germinativa (e.g., Extracranial, Extragonadal, e Ovariano), Tumor Trofoblástico Gestacional, Glioma (e.g., Adulto, Tronco Cerebral da Infância, Astrocitoma Cerebral da Infância, de Via Visual da Infância e Hipotalâmico), Leucemia de Célula

Pilosa, Câncer de Cabeça e Pescoço, Câncer Hepatocelular (Fígado), Linfoma de Hodgkin, Câncer Hipofaríngeo, Glioma de Via Visual e Hipotalâmico, Melanoma Intraocular, Carcinoma de Célula das Ilhotas (Pâncreas Endócrino), Sarcoma de Kaposi, Câncer de Rim (Célula Renal), Câncer de

5 Laríngeo, Leucemia (e.g., Linfoblástica Aguda, Mielóide Aguda, Linfocítica Crônica, Mielógena Crônica, e Célula Pilosa), Câncer de Cavidade Oral e de Lábio, Câncer de Fígado, Câncer de Pulmão de Célula Não-Pequena, Câncer de Pulmão de Célula Pequena, Linfoma (e.g., Relacionado com AIDS, de Burkitt, de Célula-T Cutânea, de Hodgkin, de Não-Hodgkin, e Sistema

10 Nervoso Central Primário), Macroglobulinemia de Waldenstrom, Histiocitoma Fibroso Maligno de Osso/Osteossarcoma, Meduloblastoma, Melanoma, Melanoma Intraocular (Olho), Melanoma de Célula de Merkel, Mesotelioma, Câncer de Pescoço Escamoso Metastático com Síndrome de Neoplasia Endócrina Múltipla, Primária Oculta, Neoplasma de Célula

15 Plasmática/Mieloma Múltiplo, Micose Fungóide, Síndromes Mieloplásticas, Doenças Mieloproliferativas/Mielodisplásticas, Leucemia Mielógena, Leucemia Mielóide Crônica, Linfoma Múltiplo, Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Sino Paranasal e Cavidade Nasal, Câncer Nasofaríngeo, Neuroblastoma, Câncer Oral, Câncer Orofaríngeo

20 Osteossarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno de Osso, Câncer Ovariano, Câncer Epitelial Ovariano, Tumor de Célula Germinativa Ovariana, Tumor Potencial Maligno Baixo Ovariano, Câncer Pancreático, Câncer Pancreático de Célula das Ilhotas, Câncer de Cavidade Nasal e de Sino Paranasal, Câncer de Paratiróide, Câncer de Pênis, Feocromocitoma, Pineoblastoma, Tumor de

25 Pituitária, Neoplasma de Célula Plasmática/Linfoma Múltiplo, Blastoma Pleuropulmonar, Linfoma de Sistema Nervoso Central Primário, Câncer de Próstata, Câncer Retal, Câncer de Célula Renal (Rim), Câncer de Célula Transicional de Uretra e de Pélvis Renal, Retinoblastoma, Rabdomiossarcoma, Câncer de Glândula Salivar, Sarcoma de Tecido Mole,

Sarcoma Uterino, Síndrome de Sezary, Câncer de Pele Não-Melanoma, Carcinoma de Pele de Célula de Merkel, Câncer de Intestino Delgado, Sarcoma de Tecido Mole, Carcinoma de Célula Escamosa, Linfoma de Célula-T Cutânea, Câncer Testicular, Timoma, Carcinoma Tímico, Câncer de Tiróide, Tumor Trofoblástico Gestacional, Carcinoma de Sítio Primário Desconhecido, Câncer de Sítio Primário Desconhecido, Câncer de Uretra, Câncer Uterino Endometrial, Sarcoma Uterino, Câncer Vaginal, Glioma Hipotalâmico e de Via Visual, Câncer Vulvar, Macroglobulinemia de Waldenstrom, e Tumor de Wilms.

Tipicamente tais composições compreendem um veículo farmaceuticamente aceitável como conhecido e chamado pela prática farmacêutica adequada, veja e.g. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, (1980), Mack Publishing Co. Exemplos de tais veículos incluem solução salina, solução de Ringe ou solução de dextrose, tamponada com tampões adequados para um pH dentro da faixa de 5 a 8. Composições farmacêuticas para injeção (e.g. por intravenosa, intraperitoneal, intradermal, subcutânea, intramuscular ou intraportal) ou infusão contínua estão adequadamente livres de material particulado visível e podem compreender entre 0,1 ng e 100mg de anticorpo, por exemplo entre 5mg e 25mg de anticorpo. Métodos para a preparação de tais composições farmacêuticas são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica. Em uma modalidade, composições farmacêuticas compreendem entre 0,1 ng e 100mg de anticorpos da invenção em forma de dosagem unitária, opcionalmente junto com instruções para uso. Composições farmacêuticas da invenção podem estar liofilizadas (secas por congelamento) para reconstituição antes da administração de acordo com métodos bem conhecidos ou evidentes por aquelas pessoas experientes na técnica. Onde modalidades da invenção compreendem anticorpos da invenção com um isótipo IgG1, um agente quelante de cobre tal como citrato (e.g. citrato de sódio) ou EDTA ou

histidina pode ser adicionado na composição farmacêutica para reduzir o grau de degradação mediada por cobre dos anticorpos deste isótipo, veja EP0612251.

5 Doses e regimes de tratamento eficazes para administração do anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo da invenção são geralmente determinadas(os) empiricamente e são dependentes de fatores tais como a idade, peso e estado de saúde do paciente e doença ou distúrbio a ser tratada(o). Tais fatores estão dentro da competência do médico atendente. Orientação sobre seleção de doses apropriadas pode ser encontrada em e.g.
10 Smith et al. (1977) "Antibodies in human diagnosis and therapy", Raven Press, New York mas em geral estará entre 1mg e 1000mg.

Convenientemente, uma composição farmacêutica compreendendo um kit de partes do anticorpo da invenção ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo junto com outros medicamentos com instruções
15 para uso também é contemplada pela presente invenção.

A invenção adicionalmente contempla uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo como aqui descrito para uso no tratamento de doenças responsivas à neutralização da interação
20 entre IGF-I e IGF-1R ou IGF-II e IGF-IR.

De acordo com a presente invenção é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal humanizado cujo anticorpo compreende um domínio V_H selecionado do grupo consistindo de: SEQ ID NO:14 e a
25 domínio V_L selecionado do grupo consistindo de: SEQIDNO:16.

De acordo com a presente invenção é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal humanizado cujo anticorpo compreende um domínio V_H selecionado do grupo consistindo de: SEQ ID NO: 15 e um

domínio V_L selecionado do grupo consistindo de: SEQ IDNO:16.

Convenientemente, uma composição farmacêutica compreendendo um kit de partes do anticorpo da invenção ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo junto com tais outros medicamentos
5 opcionalmente junto com instruções para uso também é contemplada pela presente invenção.

A invenção adicionalmente contempla uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo monoclonal ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo como
10 aqui descrito para uso no tratamento de doenças responsivas à neutralização da atividade de IGF-1R.

Em outra modalidade da invenção uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo em combinação com outros agentes terapêuticos ou terapia de radiação, por exemplo em combinação com outras
15 classes de droga incluindo inibidores mitóticos, agentes de alquilação, anti-metabólitos, antibióticos intercaladores, inibidores de fator de crescimento, inibidores do ciclo celular, enzimas, inibidores de topoisomerase, agentes de anti-sobrevivência, modificadores de resposta biológica, agentes anti-hormônios e anti-angiogênese, incluindo anti-antagonistas de receptor de fator
20 de crescimento incluindo trastuzumab (Herceptin), Erbitux (cetuximab), anticorpos anti-fator de crescimento tais como bevacizumab (Avastin), antagonistas de receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR), fator de crescimento de nervo (NGFR), receptor de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR), inibidor de tirosina quinase molecular
25 pequena por exemplo lapatinib, gefitinib, etc, agentes quimioterapêuticos incluindo gencitabine, irinotecan, paclitaxel, cisplatina, doxorubicina, topotecan, ciclofosfamida, melfalan, dacarbazine, daunorubicina, aminocamptotecina, etoposide, teniposide, adriamicina, 5-Fluorouracil, citosina arabinosídeo (Ara-C), Tiotepa, Taxotere, Buslfan, Citoxin, Txaol, Metotrexato, Vimblastine,

Bleomicin, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincristina, Vinorelbina, Carboplatina, Carminomicina, Aminopterin, Dactinomicina, usados no tratamento de doenças e distúrbios de humano tais como Artrite reumatóide, Psoríase ou Cânceres tais como: Leucemia Linfoblástica Aguda,

5 Carcinoma Adrenocortical, Cânceres Relacionados com AIDS, Linfoma Relacionado com AIDS, Câncer Anal, Astrocitoma Cerebelar da Infância, Astrocitoma Cerebral da Infância, Câncer Colorretal, Carcinoma de Célula Basal, Câncer de Duto Biliar Extra-hepático, Câncer de Bexiga, Osteossarcoma/Câncer Ósseo Histocitoma Fibroso Maligno, Tumores

10 Cerebrais (e.g., Glioma de Tronco Cerebral, Astrocitoma Cerebelar, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Ependimoma, Meduloblastoma, Tumores Neuroectodermais Primitivos Supratentoriais, Glioma Hipotalâmico e de Via Visual), Câncer de Mama, Carcinóides/Adenocarcinomas Bronquiais, Linfoma de Burkitt, Tumor Carcinóide, Tumor Carcinóide

15 Gastrointestinal, Carcinoma de Sítio Primário Desconhecido, Carcinoma de Sistema Nervoso Central Primário, Astrocitoma Cerebelar, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Câncer Cervical, Cânceres da Infância, Leucemia Linfocítica Crônica, Leucemia Mielógena Crônica, Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Cólon, Câncer Colorretal, Linfoma

20 de Célula-T Cutânea, Câncer Endometrial, Ependimoma, Câncer Esofágico, Família de Tumores de Ewing, Tumor de Célula Germinativa Extracranial, Tumor de Célula Germinativa Extragonadal, Câncer de Duto Biliar Extra-hepático, Câncer Ocular Melanoma Intraocular, Câncer Ocular Retinoblastoma, Câncer de Vesícula Biliar, Câncer Gástrico (Estômago),

25 Tumor Carcinóide Gastrointestinal, Tumores de Célula Germinativa (e.g., Extracranial, Extragonadal, e Ovariano), Tumor Trofoblástico Gestacional, Glioma (e.g., Adulto, Tronco Cerebral da Infância, Astrocitoma Cerebral da Infância, de Via Visual da Infância e Hipotalâmico), Leucemia de Célula Pilosa, Câncer de Cabeça e Pescoço, Câncer Hepatocelular (Fígado), Linfoma

de Hodgkin, Câncer Hipofaríngeo, Glioma de Via Visual e Hipotalâmico, Melanoma Intraocular, Carcinoma de Célula das Ilhotas (Pâncreas Endócrino), Sarcoma de Kaposi, Câncer de Rim (Célula Renal), Câncer de Laríngeo, Leucemia (e.g., Linfoblástica Aguda, Mielóide Aguda, Linfocítica Crônica, Mielógena Crônica, e Célula Pilosa), Câncer de Cavidade Oral e de Lábio, Câncer de Fígado, Câncer de Pulmão de Célula Não-Pequena, Câncer de Pulmão de Célula Pequena, Linfoma (e.g., Relacionado com AIDS, de Burkitt, de Célula-T Cutânea, de Hodgkin, de Não-Hodgkin, e Sistema Nervoso Central Primário), Macroglobulinemia de Waldenstrom,

10 Histiocitoma Fibroso Maligno de Osso/Osteossarcoma, Meduloblastoma, Melanoma, Melanoma Intraocular (Olho), Melanoma de Célula de Merkel, Mesotelioma, Câncer de Pescoço Escamoso Metastático com Síndrome de Neoplasia Endócrina Múltipla, Primária Oculta, Neoplasma de Célula Plasmática/Mieloma Múltiplo, Micose Fungóide, Síndromes Mieloplásticas,

15 Doenças Mieloproliferativas/Mielodisplásticas, Leucemia Mielógena, Leucemia Mielóide Crônica, Linfoma Múltiplo, Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Sino Paranasal e Cavidade Nasal, Câncer Nasofaríngeo, Neuroblastoma, Câncer Oral, Câncer Orofaríngeo Osteossarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno de Osso, Câncer Ovariano,

20 Câncer Epitelial Ovariano, Tumor de Célula Germinativa Ovariana, Tumor Potencial Maligno Baixo Ovariano, Câncer Pancreático, Câncer Pancreático de Célula das Ilhotas, Câncer de Cavidade Nasal e de Sino Paranasal, Câncer de Paratiróide, Câncer de Pênis, Feocromocitoma, Pineoblastoma, Tumor de Pituitária, Neoplasma de Célula Plasmática/Linfoma Múltiplo, Blastoma

25 Pleuropulmonar, Linfoma de Sistema Nervoso Central Primário, Câncer de Próstata, Câncer Retal, Câncer de Célula Renal (Rim), Câncer de Célula Transicional de Uretra e de Pélvis Renal, Retinoblastoma, Rabdomyosarcoma, Câncer de Glândula Salivar, Sarcoma de Tecido Mole, Sarcoma Uterino, Síndrome de Sezary, Câncer de Pele Não-Melanoma,

Carcinoma de Pele de Célula de Merkel, Câncer de Intestino Delgado, Sarcoma de Tecido Mole, Carcinoma de Célula Escamosa, Linfoma de Célula-T Cutânea, Câncer Testicular, Timoma, Carcinoma Tímico, Câncer de Tiróide, Tumor Trofoblástico Gestacional, Carcinoma de Sítio Primário Desconhecido, Câncer de Sítio Primário Desconhecido, Câncer de Uretra, Câncer Uterino Endometrial, Sarcoma Uterino, Câncer Vaginal, Glioma Hipotalâmico e de Via Visual, Câncer Vulvar, Macroglobulinemia de Waldenstrom, e Tumor de Wilms.

O anticorpo ou seus fragmentos de ligante de antígeno da presente invenção podem ser usados por exemplo em combinação com um ou mais agentes terapeuticamente ativos ou radiação por exemplo em combinação com outras classes de droga incluindo inibidores mitóticos, agentes de alquilação, anti-metabólitos, antibióticos intercaladores, inibidores de fator de crescimento, inibidores do ciclo celular, enzimas, inibidores de topoisomerase, agentes de anti-sobrevivência, modificadores de resposta biológica, agentes anti-hormônios e anti-angiogênese, incluindo anti-antagonistas de receptor de fator de crescimento incluindo trastuzumab (Herceptin), Erbitux (cetuximab), anticorpos anti-fator de crescimento tais como bevacizumab (Avastin), antagonistas de receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR), fator de crescimento de nervo (NGFR), receptor de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR), agentes anti-IGF-1R de molécula pequena, inibidor de tirosina quinase molecular pequena incluindo lapatinib, gefitinib, etc, agentes quimioterapêuticos incluindo gencitabine, irinotecan, paclitaxel, cisplatina, doxorubicina, topotecan, ciclofosfamida, melfalan, dacarbazine, daunorubicina, aminocamptotecina, etoposide, teniposide, adriamicina, 5-Fluorouracil, citosina arabinosídeo (Ara-C), Tiotepa, Taxotere, Buslfan, Citoxin, Txaol, Metotrexato, Vimblastina, Bleomicina, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincristina, Vinorelbina, Carboplatina, Carminomicina, Aminopterin, Dactinomycin.

A invenção assim fornece, em uma outra modalidade, o uso de uma tal combinação no tratamento de doenças onde sinalização de receptor de IGF-1 contribui para a doença ou onde neutralização da atividade do receptor será benéfica e o uso do anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo na manufatura de um medicamento para a terapia de combinação de distúrbios tais como Artrite reumatóide, Psoríase ou Cânceres tais como:

5 Leucemia Linfoblástica Aguda, Carcinoma Adrenocortical, Cânceres Relacionados com AIDS, Linfoma Relacionado com AIDS, Câncer Anal, Astrocitoma Cerebelar da Infância, Astrocitoma Cerebral da Infância, Câncer

10 Colorretal, Carcinoma de Célula Basal, Câncer de Duto Biliar Extra-hepático, Câncer de Bexiga, Osteossarcoma/Câncer Ósseo Histocitoma Fibroso Maligno, Tumores Cerebrais (e.g., Glioma de Tronco Cerebral, Astrocitoma Cerebelar, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Ependimoma, Meduloblastoma, Tumores Neuroectodermas Primitivos Supratentoriais,

15 Glioma Hipotalâmico e de Via Visual), Câncer de Mama, Carcinóides/Adenocarcinomas Bronquiais, Linfoma de Burkitt, Tumor Carcinóide, Tumor Carcinóide Gastrointestinal, Carcinoma de Sítio Primário Desconhecido, Carcinoma de Sistema Nervoso Central Primário, Astrocitoma Cerebelar, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Câncer Cervical, Cânceres

20 da Infância, Leucemia Linfocítica Crônica, Leucemia Mielógena Crônica, Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Cólon, Câncer Colorretal, Linfoma de Célula-T Cutânea, Câncer Endometrial, Ependimoma, Câncer Esofágico, Família de Tumores de Ewing, Tumor de Célula Germinativa Extracranial, Tumor de Célula Germinativa Extragonadal, Câncer de Duto

25 Biliar Extra-hepático, Câncer Ocular Melanoma Intraocular, Câncer Ocular Retinoblastoma, Câncer de Vesícula Biliar, Câncer Gástrico (Estômago), Tumor Carcinóide Gastrointestinal, Tumores de Célula Germinativa (e.g., Extracranial, Extragonadal, e Ovariano), Tumor Trofoblástico Gestacional, Glioma (e.g., Adulto, Tronco Cerebral da Infância, Astrocitoma Cerebral da

Infância, de Via Visual da Infância e Hipotalâmico), Leucemia de Célula Pilosa, Câncer de Cabeça e Pescoço, Câncer Hepatocelular (Fígado), Linfoma de Hodgkin, Câncer Hipofaríngeo, Glioma de Via Visual e Hipotalâmico, Melanoma Intraocular, Carcinoma de Célula das Ilhotas (Pâncreas

5 Endócrino), Sarcoma de Kaposi, Câncer de Rim (Célula Renal), Câncer de Laríngeo, Leucemia (e.g., Linfoblástica Aguda, Mielóide Aguda, Linfocítica Crônica, Mielógena Crônica, e Célula Pilosa), Câncer de Cavidade Oral e de Lábio, Câncer de Fígado, Câncer de Pulmão de Célula Não-Pequena, Câncer de Pulmão de Célula Pequena, Linfoma (e.g., Relacionado com AIDS, de

10 Burkitt, de Célula-T Cutânea, de Hodgkin, de Não-Hodgkin, e Sistema Nervoso Central Primário), Macroglobulinemia de Waldenstrom, Histiocitoma Fibroso Maligno de Osso/Osteossarcoma, Meduloblastoma, Melanoma, Melanoma Intraocular (Olho), Melanoma de Célula de Merkel, Mesotelioma, Câncer de Pescoço Escamoso Metastático com Síndrome de

15 Neoplasia Endócrima Múltipla, Primária Oculta, Neoplasma de Célula Plasmática/Mieloma Múltiplo, Micose Fungóide, Síndromes Mieloplásticas, Doenças Mieloproliferativas/Mielodisplásticas, Leucemia Mielógena, Leucemia Mielóide Crônica, Linfoma Múltiplo, Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Sino Paranasal e Cavidade Nasal,

20 Câncer Nasofaríngeo, Neuroblastoma, Câncer Oral, Câncer Orofaríngeo Osteossarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno de Osso, Câncer Ovariano, Câncer Epitelial Ovariano, Tumor de Célula Germinativa Ovariana, Tumor Potencial Maligno Baixo Ovariano, Câncer Pancreático, Câncer Pancreático de Célula das Ilhotas, Câncer de Cavidade Nasal e de Sino Paranasal, Câncer de Paratiróide, Câncer de Pênis, Feocromocitoma, Pineoblastoma, Tumor de

25 Pituitária, Neoplasma de Célula Plasmática/Linfoma Múltiplo, Blastoma Pleuropulmonar, Linfoma de Sistema Nervoso Central Primário, Câncer de Próstata, Câncer Retal, Câncer de Célula Renal (Rim), Câncer de Célula Transicional de Uretra e de Pélvis Renal, Retinoblastoma,

Rabdomiossarcoma, Câncer de Glândula Salivar, Sarcoma de Tecido Mole, Sarcoma Uterino, Síndrome de Sezary, Câncer de Pele Não-Melanoma, Carcinoma de Pele de Célula de Merkel, Câncer de Intestino Delgado, Sarcoma de Tecido Mole, Carcinoma de Célula Escamosa, Linfoma de
5 Célula-T Cutânea, Câncer Testicular, Timoma, Carcinoma Tímico, Câncer de Tiróide, Tumor Trofoblástico Gestacional, Carcinoma de Sítio Primário Desconhecido, Câncer de Sítio Primário Desconhecido, Câncer de Uretra, Câncer Uterino Endometrial, Sarcoma Uterino, Câncer Vaginal, Glioma Hipotalâmico e de Via Visual, Câncer Vulvar, Macroglobulinemia de
10 Waldenstrom, e Tumor de Wilms.

Quando o anticorpo ou seus fragmentos de ligante de antígeno da presente invenção são usados em combinação com outros agentes terapeuticamente ativos, os componentes podem ser administrados quer juntos quer separadamente, seqüencialmente ou simultaneamente por qualquer rota
15 conveniente.

As combinações referidas acima podem ser convenientemente apresentadas para uso na forma de uma formulação farmacêutica e assim formulações farmacêuticas compreendendo uma combinação como definida acima otimamente junto com um excipiente ou veículo farmaceuticamente
20 aceitável compreende uma outra modalidade da invenção. Os componentes individuais de tais combinações podem ser administrados quer juntos quer separadamente, seqüencialmente ou simultaneamente em formulações farmacêuticas combinadas ou separadas.

Quando combinados na mesma formulação será reconhecido
25 que os dois componentes precisam ser estáveis e compatíveis entre si e com os outros componentes da formulação e podem ser formulados para administração. Quando formulados separadamente podem ser fornecidos em qualquer formulação conveniente, convenientemente em uma tal maneira como as conhecidas para anticorpos e seus fragmentos de ligante de antígeno

na técnica.

Quando em combinação com um segundo agente terapêutico ativo contra a mesma doença, a dose de cada componente pode diferir daquela quando o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo é usado sozinho. Doses apropriadas serão prontamente estimadas por aquelas pessoas experientes na técnica.

A invenção assim fornece, em uma outra modalidade, uma combinação compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo da presente invenção junto com outro agente terapeuticamente ativo.

A combinação referida acima pode ser convenientemente apresentada para uso na forma de uma formulação farmacêutica e assim formulações farmacêuticas compreendendo uma combinação como definida acima junta com um veículo farmacêuticamente aceitável da mesma representa uma outra modalidade da invenção.

Os seguintes exemplos ilustram vários aspectos da invenção. Estes exemplos não limitam o escopo desta invenção que é definido pelas reivindicações anexadas.

Exemplos

Exemplo 1 - Geração de anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais (mAbs) foram produzidos por células de hibridoma de acordo com o método descrito em E Harlow e D Lane, Antibodies a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Camundongos SJL foram inicialmente inoculados e reforçados por injeção intraperitoneal com IGF-1R recombinante de humano (R&D Systems, #305-GR) em adjuvante RIBI. Baços dos animais respondedores foram colhidos e fusionados em células de Mieloma X63Ag8653GFP1L5 para gerar hibridomas. O material sobrenadante de hibridoma foi selecionado para ligação em IGF-1R usando FMAT (ABI8200) e BIAcore A100. O ABI8200

foi usado para confirmar ligação em IGF-1R recombinante (R&D Systems - 305-GR-050 e 391-GR-050) e IGF-1R de humano expressado por HEK293T, IGF-1R de macaco cinomolgo expressado por HEK293T e ausência de ligação em receptor de insulina de humano expressado por HEK293T. O

5 BIAcore A100 foi usado para estimar a cinética de ligação de anticorpos produzidos por hibridoma em IGF-1R recombinante (R&D Systems, #305-GR). Anticorpos foram capturados sobre a pastilha usando uma IgG de coelho anti-camundongo (BR-1005-14, Biacore AB). Hibridomas de interesse foram monoclonados usando meios semi-sólido (solução de metil-celulose),

10 Omnitrays e o sistema ClonePix FL.

Exemplo 2 - Aumento de escala e purificação de material de hibridoma e anticorpos monoclonais.

Hibridomas a terem escala aumentada foram crescidos em cultura de tecido para a escala de 4 frascos confluentes de 225cm². Neste

15 ponto as células foram colhidas por centrifugação a 400g por 5 minutos. A pelota foi ressuspensa com 100 mL de meio livre de soro (JRH610) para lavar as células. As células foram então centrifugadas a 400g por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e jogado fora. 150 mL de meio livre de soro novo foram usados para ressuspender a pelota celular. A suspensão de células foi

20 então transferida para um frasco novo de 225cm² e deixada em uma incubadora por um período de 5 dias. O sobrenadante foi então colhido e centrifugado a 400g por 20 minutos. O sobrenadante foi colhido e esterilmente filtrado com um filtro de 0,2 µm em preparação para purificação. O anticorpo foi purificado usando colunas de resina de proteína A. O

25 anticorpo purificado foi dialisado contra PBS pH7,4.

Exemplo 3- Construção de vetores de expressão de IGF-1R

Geração de cassete de expressão para IGF-1R de humano de comprimento total

O cassete de expressão de cDNA de IGF-1R de humano foi

idêntico ao Genbank X04434 exceto para uma mudança no nucleotídeo 3510. Esta resulta na mudança silenciosa do códon para glicina 1170 de “GGC” para “GGG”. cDNA de IGF-1R de humano foi expressado do vetor pcDNA3,1(-) (Invitrogen). A sequência do IGF-1R de humano é mostrada em
5 SEQ ID NO 44.

Geração de cassete de expressão para IGF-R murino de comprimento total

O cassete de expressão de cDNA de IGF-1R murino foi idêntico ao Genbank AF056187 exceto para uma mudança em nucleotídeo 3522. Esta resultou na mudança silenciosa do códon para glicina 1174 de
10 “GGT” para “GGG”. Os cDNAs de IGF-1R murino foram expressados de vetores pcDNA3.1D-V5-His TOPO (Invitrogen). A sequência de IGF-1R murino é mostrada em SEQ ID NO 46.

Geração de cassete de expressão para IGF-1R de macaco cinomolgo (*Macaca fascicularis*) de comprimento total

15 A sequência nova para cIGF-1R de macaco cinomolgo foi clonada por PCR de uma biblioteca de cDNA de rim de macaco cinomolgo. Iniciadores foram baseados na entrada de banco de dados de IGF-1R de humano, NM_000875. Iniciadores de PCR foram planejados com um motivo de Kozak na extremidade 5' e com sítios de restrição BamHI e NotI
20 flanqueando. O produto de BamHI-NotI PCR foi clonado em pCDNA3.1 D com as sequências de vetor T7 próximas da extremidade 5' da sequência codificadora de IGF-1R. O cDNA obtido é 99,6% idêntico a uma sequência de humano em nível de proteína (diferenças de 4aa em relação à sequência humana). A sequência de IGF-1R de macaco cinomolgo é mostrada em SEQ
25 ID NO 45.

Geração de cassete de expressão para receptor de Insulina de humano de comprimento total (Tipo B)

Um cassete de DNA codificador de receptor de insulina de humano de tipo B (SEQ ID NO 53) foi clonado em pcDNA3.1 (Invitrogen).

Para comparação, a sequência codificadora de SEQ ID NO 53 é idêntica à sequência dada em entrada de Genbank:M10051, exceto pelas seguintes mudanças: A numeração de nucleotídeo é baseada em “A” da metionina de iniciação sendo nucleotídeo 1 (que corresponde à posição 139 da sequência de nucleotídeos em M10051).

Nucleotídeo	Aminoácido	SEQ ID No 53	M10051
511	171	TAC (Tyr)	CAC (His)
783	261	GAT (Asp)	GAC (Asp)
909	303	CAG (Gln)	CAA (Gln)
1343	448	ATC (Ile)	ACC (Thr)
1474	492	CAG (Gln)	AAG (Lys)
1638	546	GAC (Asp)	GAT (Asp)
1650	550	GCA (Ala)	GCG (Ala)
3834	1278	AAC (Asn)	AAG (Lys)

Vetores para IGF-1Rs de humano, murino e de macaco cinomolgo e receptor de insulina de tipo B foram expressados transientemente em células 293 HEK-T usando protocolos padrão e reagente Lipofectamine (Invitrogen).

10 Exemplo 4 - Geração de e expressão de proteínas recombinantes usando BacMam

Construção de estrutura principal de vetor pFastBacMam

pFastBac 1 (Invitrogen) foi digerido com SnaBI e HpaI para remover o promotor de poliedrina. Este foi ligado com um fragmento Nrul-Bst11071 de 3,1kb de pcDNA3 (Invitrogen) que contém o promotor precoce imediato de Citomegalovírus (CMV IE) com um poliligante e sítio BGH poli A e o promotor SV40 dirigindo a expressão do gene de resistência a G418. Este vetor permitirá a produção de um baculovírus que expressa um gene sob o controle do promotor CMV em células de mamífero. Também é possível selecionar derivados estáveis para por as células sob seleção de G418.

Proteína de fusão de IGF-1R de humano - Fc

Foi construído um plasmídeo planejado para expressar seqüências de domínio extracelular de IGF-1R de humano fusionadas em um sítio de clivagem de fator Xa e seqüências de Fc de humano de IgG1.

Seqüências codificadoras do domínio extracelular (aminoácidos 1-935) do cDNA de IGF-1R de humano foram amplificadas por PCR e fusionadas em um sítio de clivagem de Fator Xa e seqüências Fc de IgG1 de humano. O inserto inteiro foi então subclonado como um fragmento HindIII-BamHI no
5 vetor de expressão pFastBacMam. A seqüência de IGF-1R de humano - proteína de fusão Fc é mostrada em SEQ ID NO 47.

Proteína de fusão de IGF-1R de macaco cinomolgo (*Macaca fascicularis*) - Fc

Foi construído um plasmídeo planejado para expressar
10 seqüências de domínio extracelular de IGF-1R de macaco cinomolgo fusionadas em um sítio de clivagem de fator Xa e seqüências de Fc de humano de IgG1. O plasmídeo de expressão de IGF-1R de humano foi modificado pela remoção de um fragmento XbaI de 82 pb da estrutura principal do vetor por corte com XbaI e re-ligação. Isto remove um segundo
15 sítio NotI. A seqüência codificadora do domínio extracelular de IGF-1R de macaco cinomolgo (aminoácidos 1-935) foi amplificada por PCR como um fragmento HindIII-NotI e ligada no plasmídeo de expressão de IGF-1R modificado que havia sido cortado com HindIII e NotI para remover as seqüências de humano. A seqüência de IGF-1R de macaco cinomolgo -
20 proteína de fusão Fc é mostrada em SEQ ID NO 48.

Expressão de proteínas recombinantes usando BacMam

Vetores plasmídeo codificadores de seqüências de domínio extracelular de IGF-1R de macaco cinomolgo e de humano fusionadas em um sítio de clivagem de Fator Xa e seqüências Fc de IgG1 de humano foram
25 usados para dirigir a expressão de proteína usando o sistema BacMam. Baculovírus foram gerados usando o sistema Invitrogen Bac-to-Bac. O estoque de P0 inicial foi escalado para um estoque P1 de um litro usando procedimentos padrão. Produção de proteína foi iniciada por infecção de 1-5 litros de células HEK293-F em cultura em suspensão com o vírus BacMam

exigido (tipicamente em uma multiplicidade de infecção (MOI)) de 10 para 100 para 1 embora isto fosse costumeiramente otimizado para maximizar a produção de proteína). Após cultura de 2-3 dias o sobrenadante de cultura celular foi colhido, células foram removidas por centrifugação e a proteína expressada foi então purificada do sobrenadante clarificado.

Exemplo 5 - Construção de plasmídeos de expressão de ligante de IGF-1R

Seqüências de gene para as formas processadas de IGF-I (aminoácidos 49-118, Swiss-prot P01343) e IGF-II (aminoácidos 25-91, Swiss-prot P01344) foram codon-otimizadas para expressão em *E.coli*. Os genes foram preparados de novo por desenvolvimento de oligonucleotídeos de recobrimento e clonados nos sítios NdeI-BamHI de pET-21b (Novagen). Para a produção de ligantes de IGF-1R biotinilados, uma seqüência de etiqueta de biotilação de 15 aminoácidos C-terminal (GLNDIFEAQKIEWHE, ref: Schatz (1993) Biotechnology (N Y), 11(10):1138-43) SEQ ID NO: 17 foi incluída no desenvolvimento do gene.

As seqüências de ligante IGF-I e de ligante IGF-II de humano são mostradas em SEQ ID NO 49. e SEQ ID NO 51 respectivamente.

Exemplo 6 - Expressão e purificação de ligantes de IGF-1R

Plasmídeos foram transformados em células de *E. coli* BL21(DE3) então expressão foi realizada usando meio LB com 100µg/ml de ampicilina após indução com IPTG 1mM a 37°C por 16 horas. As pelotas celulares foram colhidas por centrifugação. Ligantes IGF-1R foram isolados como corpos de inclusão insolúveis por ressuspensão de pelotas celulares em Tris 50mM pH8,0, NaCl 200mM, EDTA 1mM, DTT 5mM, lisados por sonificação e recuperados na fração de corpos de inclusão por centrifugação. Ligantes IGF-1R solúveis foram produzidos por solubilização dos corpos de inclusão em Tris 50mM pH8,0, Cloridrato de Guanidina 6M, então rapidamente diluindo em um excesso de volume de 100 vezes de Tris 50mM pH8,0, glutathione oxidada 1mM, glutathione reduzida 1mM seguido por

misturação por 16 horas a 4°C. Proteína solúvel foi concentrada e centrifugada para remover material insolúvel então ligantes IGF-1R biologicamente ativos foram purificados por HPLC em fase reversa usando uma coluna Spherisorb C6 (Waters) com um gradiente de acetonitrila.

5 Para ligantes IGF-1R com etiquetas de biotinilação, biotinilação foi realizada pela adição de ATP 5mM, MgCl₂ 5mM, d-biotina 1mM e biotina ligase 1 µM nas proteínas purificadas. A mistura foi incubada na temperatura ambiente por 3 horas. Os ligantes IGF-1R biotinilados foram purificados por cromatografia de exclusão de tamanho usando uma coluna
10 Superdex 75 (GE Healthcare). Ligantes IGF-1R purificados foram dialisados contra PBS, quantificados usando padrões BSA e um ensaio de proteína baseado em BioRad coomassie então armazenados em alíquotas a -80°C. Pesos moleculares de proteínas purificadas foram verificados por espectrometria de massa. As seqüências de ligante IGF-I etiquetado e ligante
15 IGF-II etiquetado de humano são mostradas em SEQ ID NO 50. e SEQ ID NO 52 respectivamente.

Exemplo 7. - Seqüenciamento de domínios variáveis de hibridomas

RNA total foi extraído de pelotas de aproximadamente 10⁶ células para cada clone de hibridoma usando o RNeasy kit de Qiagen
20 (#74106). Promega AccessQuick RT-PCR System (A1702) foi usado para produzir cDNA das regiões leve e pesada variáveis usando iniciadores degenerados específicos para as seqüências líderes murinas e regiões constantes IgG1/_K ou IgG2b/_K murinas. Os fragmentos de RT-PCR purificados foram clonados usando TA cloning kit (Invitrogen (K2030-40)) e
25 uma seqüência de consenso foi obtida para cada hibridoma por alinhamento de seqüências, pesquisa em KABAT (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Os números de listagem de seqüências dos domínios variáveis de hibridomas 6E11, 9C7, 2B9, 15D9 e

5G4 são mostrados em Tabela 1 abaixo:

Hibridoma	SEQ ID. NO: de região pesada variável	SEQ ID. NO: de região leve variável
6E11	8	9
9C7	18	19
2B9	10	11
5G4	20	21
15D9	22	23

Tabela 1 - SEQ I.D. NO: das regiões pesada e leve variáveis dos hibridomas. Notar que as seqüências mostradas em Tabela 1 não incluem seqüências de sinal.

5 Exemplo 8: Construção de anticorpos quiméricos

Anticorpos quiméricos, compreendendo domínios variáveis murinos parentais enxertados em regiões constantes de tipo selvagem de IgG1/ κ de humano foram construídos por clonagem por PCR. Baseado na seqüência de consenso, iniciadores para amplificar os domínios variáveis murinos foram planejados, incorporando sítios de restrição exigidos para facilitar a clonagem em vetores de expressão em mamífero. As cadeias pesada e leve de comprimento total do anticorpo quimérico 6E11 (6E11c) são dadas em SEQ I.D. NO: 24 e SEQ I.D. NO: 25.

Exemplo 9: Estratégia de humanização

15 Anticorpos humanizados foram gerados por um processo de enxerto de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1 e CDRL3 do anticorpo 6E11 murino e CDRL2 do anticorpo 9C7 murino em uma seqüência de molde de humano adequada.

20 A seqüência do domínio leve variável humanizado de L0 é dada em (SEQ I.D. NO: 16).

As seqüências dos domínios pesados variáveis humanizados de H0 e H1 são dadas em (SEQ I.D. NO: 14 e SEQ I.D. NO: 15 respectivamente). Seqüências de nucleotídeos otimizadas codificadoras destas seqüências são mostradas em SEQ ID NO:34 (H0), 35 (H1) e 36 (L0).
25 Seqüências de domínios variáveis L0 e H0 alternativas são dadas em SEQ ID

NO: 61 e 62 respectivamente, seqüências de cadeia leve L0 e de cadeia pesada H0 alternativas são dadas em SEQ ID NO: 69 e 70.

Construção de vetores de anticorpo humanizado

5 Fragmentos de DNA codificadores de regiões pesada e leve variáveis humanizadas foram construídos de novo usando uma estratégia baseada em PCR e oligonucleotídeos de recobrimento. O produto de PCR foi clonado em vetores de expressão em mamífero contendo a região constante gama 1 de humano e a região constante kappa de humano respectivamente. Esta é a região Fc de tipo selvagem.

10 Usando uma estratégia similar, as regiões pesadas variáveis foram também clonadas em uma variante da região constante gama 1 de humano que continha duas substituições de alanina L235A e G237A (numeração de índice EU). Estes construtos são aqui chamados de IgG1m(AA). Os dois construtos humanizados que compreendiam a variante
15 IgG1m(AA) são mostrados como H0L0 IgG1m(AA) (SEQ ID NO 54 e SEQ ID NO 39) e H1L0 IgG1m(AA) (SEQ ID NO 56 e SEQ ID NO 39).

A não ser que seja indicado de outro modo todos os construtos humanizados usando nos exemplos aqui compreendem regiões constantes gama 1 de humano de tipo selvagem.

20 Exemplo 10 - Expressão de anticorpo recombinante em células CHO

Plasmídeos de expressão codificadores das cadeias pesada e leve respectivamente de anticorpos quiméricos ou humanizados foram transientemente co-transfectados em células CHO-K1. Em algumas situações o material de sobrenadante foi usado como o artigo de teste em ensaios de
25 ligação e de atividade. Em outras situações, o material de sobrenadante foi esterilizado por filtração e o anticorpo foi recuperado por cromatografia de afinidade usando Proteína A. Anticorpos também foram expressados em um sistema de célula CHO policlonal. Vetores de DNA codificadores das cadeias pesada e leve foram co-eletroporados em células CHO em suspensão. Células

foram passadas em frascos de agitação em meio seletivo basal MR1a 37°C, 5%CO₂, 130-150rpm até viabilidade celular e contagens de células melhoradas. Células CHO foram então inoculadas em meio seletivo MR1 basal x2 e incubadas por 10 a 14 dias a 34°C, 5%CO₂, 130-150rpm. As células foram pelotizadas por centrifugação e o sobrenadante esterilmente filtrado. Anticorpo foi recuperado por purificação em Proteína A.

Dados comparativos entre hibridomas e/ou mAbs quiméricos e/ou Mabs humanizados

Exemplo 11 - ELISA de Ligação de Receptor

0,4µg/mL de IGF-1R recombinante de humano etiquetado com histidina (R&D Systems, #305-GR-050) foi capturado sobre uma placa de ELISA revestida com 0,5-1µg/mL de anticorpo policlonal de coelho para 6xHis (Abeam, #ab9108). Anticorpos Anti-IGF-1R dos sobrenadantes de teste ou material purificado foram titulados através da placa. Os níveis de receptor-ligado foram detectados pelo tratamento com um anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase de rábano (HRP) (Dako, P0260) ou anticorpo de cabra anti-Cadeias Leves Kappa de humano conjugado com peroxidase (Sigma, A7164). O ELISA foi revelado usando o substrato de peroxidase dicloridrato de O-fenileno-diamina (OPD) (Sigma, P9187).

Figura 1. mostra as curvas de ligação para anticorpos murinos 6E11, 5G4 e 15D9. Figura 2. mostra as curvas de ligação para H0L0 e H1L0 e H0L0 IgG1m(AA) e H1L0 IgG1m(AA) confirmando que têm atividade de ligação similar quando comparados com a quimera 6E11. Outros anticorpos monoclonais foram testados (dados não mostrados).

Exemplo 12 - Regulação negativa de receptor

Células 3T3/LISN c4 (linhagem de célula NIH 3T3 murina expressando IGF-1R de humano, veja Kaleko et al. (1990) Molecular and Cellular Biology, 10 (2): 464-473) foram incubadas com 5 µg/mL de anticorpo a 37°C por 24 horas antes de as células serem colhidas. Lisados

destas pelotas de célula foram corridos sobre um gel de SDS PAGE e transferidas para membrana de PVDF (*Western blot*). IGF-1R foi detectado por tratamento com um anticorpo de coelho anti IGF-1R β C-20 (Santa Cruz Biotechnology, sc-713) seguido pelo tratamento com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com HRP (P0217) e detectado usando reagente de quimioluminescência intensificado (ECL) (GE Healthcare).

Figura 3 mostra que a incubação de células 3T3/L1SN c4 com anticorpo monoclonal 6E11 resulta em regulação negativa da cadeia IGF-1R β .

Em um experimento similar, níveis de receptor foram ensaiados em células NCI-H838 após tratamento com H0L0. Células NCI-H838 (1×10^6 /cavidade) expressando IGF-1R de humano foram incubadas com 5 μ g/cavidade de H0L0 por vários tempos até 24 horas. Células foram então colhidas e as pelotas de célula foram lisadas e corridas sobre um gel de SDS PAGE, transferidas para membrana de PVDF e manchada para IGF-1R usando um anticorpo de coelho anti-IGF-1R β c-20 (Santa Cruz, sc713). Ligação foi detectada com um anticorpo anti-coelho HRP (Dako, P0217). As pistas sobre o *Western blot* da esquerda para a direita são: Sem anticorpo de controle (colhido em 24 horas), então colheitas em 0, 0,2, 0,5, 1, 1,5, 3, 6 e 24 horas. Figura 4 mostra que H0L0 induz degradação tão cedo quanto 30 minutos (0,5h) após exposição, embora exposição continuada de 3 horas seja exigida para níveis de IGF-1R alcançarem um nível basal. Em outro experimento, incubação de células Colo205 com vários anticorpos incluindo 6E11 parental, 6E11 quimera, H0L0 por 24 horas causou uma redução substancial em níveis de receptor determinados por *Western blot* para o IGF-1R (cadeia- β (dados não mostrados).

Em um experimento de acompanhamento, células de carcinoma de pulmão NCI-H838 foram tratadas com os anticorpos anti-IGF-1R terapêuticos humanizados. Células NCI-H838 foram soro-estioladas por 24 horas e quer não tratadas (controle), quer tratadas por 24 horas com H0L0,

H0L0 IgG1m(AA) ou IgG de humano não-selecionadora (controle) 120nM. Células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas sobre gelo por 10 minutos com tampão de lise NP40 1%, clarificadas por centrifugação a 16400rpm por 20 minutos a 4°C e 50µg de proteínas celulares solúveis submetidas à SDS PAGE redutora em geles de poliacrilamida 4 a 12%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e imobilizadas quer para IGF-1R quer para receptor de Insulina. Membranas também foram imunomanchadas para uma α -tubulina para avaliar a carga através de cada pista. Anticorpos secundários fluorescentemente marcados foram usados e as quantidades de IGF-1R, receptor de Insulina e α -tubulina foram quantificadas usando um sistema de imagem LI COR Odyssey. Os anticorpos primário e secundário usados foram selecionados de Alexa680, cabra anti-coelho, Molecular Probes #A-21076. Usado 1/20000 = 0,5ml em 10ml (45min a 25°C), IRDye800, burro anti-camundongo, Rockland #610-732-124. Usado 1/10000 = 1ml em 10ml (45min a 25°C) e IRDye800, burro anti-coelho, Rockland #611-732-127. Usado 1/10000 = 0,5ml em 5ml (45min a 25°C).

A subunidade β de 97kDa de IGF-1R e o IGF-1R de comprimento total de 200kDa e a subunidade β de 95kDa de receptor de Insulina e o receptor de Insulina de comprimento total de 200kDa e α -tubulina de 50kDa são mostrados em figura 5. Incubação com os anticorpos humanizados resultou em níveis significativamente diminuídos de IGF-1R - aproximadamente 80% de redução relativa às amostras tratadas com anticorpo de controle (Figura 5). Isto foi acompanhado por um decréscimo em níveis de receptor de Insulina, mais provavelmente devido à degradação de heterodímeros de receptor de Insulina / IGF-1R.

Regulação negativa de receptor em células LISN/3T3 c4 também foi demonstrada usando um ensaio baseado em FACS em sangue inteiro (empobrecido em células vermelhas do sangue). H0L0 foi adicionado

por 24 horas a 4°C ou 37°C em uma amostra de sangue inteiro de um doador (Doador 90263). Figura 6 mostra um histograma de recobrimento de intensidade fluorescente para a população de granulócito e de linfócito (ajustado usando perfis de dispersão lateral e anterior) a 4°C (linha sólida) e 37°C (linha pontilhada). Após incubação, níveis de receptor foram avaliados usando anticorpo 1H7 anti-IGF-1R marcado com PE (BD Pharmingen, #555999). Em um experimento diferente H0L0 ou Controle IgG foram adicionados por 24 horas a 4°C ou 37°C em uma amostra de sangue inteiro de um doador diferente (Doador 90691). Figura 7 mostra um histograma de recobrimento da intensidade fluorescente ou da população de granulócito a 4°C e 37°C comparado com um controle isótipo. Em ambos doadores, incubação a 37°C por 24 horas causou uma redução marcante na intensidade de fluorescência comparado com a incubação de mesma linhagem celular a 4°C. O ensaio foi repetido com amostras de sangue inteiro de vários outros doadores com um efeito total similar, embora a magnitude de regulação negativa e expressão de receptor variasse de doador para doador. Um número pequeno de doadores mostrou expressão de receptor muito baixa que não foi afetada pela incubação com anticorpo.

Exemplo 13 - Inibição de fosforilação de receptor estimulada por IGF-I ou IGF-II

Células 3T3/LISN c4 foram plaqueadas em uma densidade de 10.000 células/cavidade em placas de 96 cavidades e permitidas crescer por 1-2 dias em DMEM completo (modificação DMEM-Hepes + 10%FCS). Anticorpos anti-hlGF-1R (sobrenadantes de hibridoma ou anticorpos purificados) foram adicionados nas células e incubados por 1 hora. Qualquer 30-50ng de rhIGF-1(R&D Systems 291-G1 ou 50ng/ml de rhIGF-1 (veja Exemplo 5 e 6) ou 100ng/ml de rhIGF-2 (R&D Systems 292-G2) (veja Exemplo 5 e 6) foi adicionado nas células tratadas e incubados por mais 20-30 mins para estimular fosforilação de receptor. Células foram lavadas uma

vez em PBS e então lisadas pela adição de tampão de lise RIPA (NaCl 150mM, Tris HCl 50mM, Desóxicolato de Na 6mM, Tween 20 1%) mais coquetel de inibidor de protease (Roche 11 697 498 001). A placa foi congelada por 30 minutos ou durante a noite. Após descongelamento, lisado de cada cavidade foi transferido para uma placa de ELISA de 96 cavidades pré-revestida com um anticorpo de captura anti IGF-1R (R&D Systems MAB391) a 2µg/ml e bloqueado com 4%BSA/TBS. Em alguns experimentos um anticorpo de captura alternativo foi usado (2B9 SEQ ID NO: 10 e 11 revestido a 1µg/ml). A placa foi incubada durante a noite a 4°C. A placa foi lavada com TBST (TBS+Tween 200 0,1%) e um anticorpo anti-Fosfotirosina marcado com Európio (PerkinElmer DELFIA Eu-N1 PT66) diluído 1/2500 em 4%BSA/TBS foi adicionado em cada cavidade. Após incubação de 1 hora a placa foi lavada e foi adicionada solução DELFIA Enhancement (PerkinElmer 1244-105). Após incubação de 10 min o nível de fosforilação de receptor foi determinado usando uma leitora de placa ajustada para medir fluorescência resolvida por tempo (TRF) de Európio.

Figura 8 mostra um exemplo da inibição de fosforilação de receptor mediada por anticorpos monoclonais murinos purificados 6E11, 5G4 e 15D9, dados colhidos para experimentos feitos ao mesmo tempo para placas diferentes com experimentos realizados ao mesmo tempo.

Figura 9 mostra um exemplo da inibição de fosforilação de receptor mediada por H1L0 em comparação com o anticorpo quimérico 6E11 (6E11c).

Figura 10 mostra um exemplo da inibição de fosforilação de receptor mediada por H0L0 e H1L0 no contexto de uma região de Fc de IgG1 de tipo selvagem e uma região Fc de IgG1 substituída (IgG1m(AA)).

Em um conjunto diferente de experimentos usando uma metodologia similar, os valores de IC₅₀ para inibição de fosforilação de receptor foram obtidos e confirmam que o anticorpo parental murino 6E11 e

humanizado mostra perfis comparáveis para inibição de fosforilação de receptor mediada por IGF-I e IGF-II (Tabela 2).

5 Tabela 2 - Valores de IC_{50} para anticorpos seleccionados em ensaios de fosforilação estimulada por IGF-I e IGF-II com intervalos de confiança inferior e superior de 95%

	IC_{50} de estimulação por IGF-I ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} de estimulação por IGF-II ($\mu\text{g/ml}$)
Anticorpo		
H0L0	0,06069	0,08145
H1L0	0,08359	0,10546
H0L0IgG1m(AA)	0,08485	0,09968
H1L0 IgG1m(AA)	0,08263	0,10546
6E11 Parental	0,02445	n/a

Em um conjunto diferente de experimentos usando uma metodologia similar, os valores de IC_{50} para inibição de fosforilação de receptor foram obtidos e confirmam que anticorpo humanizado H0L0 e o anticorpo parental murino 6E11 mostram atividade comparável. Em paralelo,
 10 a atividade dos anticorpos contra o receptor de insulina foi testada usando uma linhagem de célula 3T3 engenheirada para expressar o receptor de insulina de humano. Neste experimento, nenhuns dos anticorpos mostraram inibição de fosforilação de receptor induzida por insulina.

15 Tabela 2a Valores de IC_{50} para anticorpos seleccionados em ensaios de IGF-IR e IR DELFIA. Cada valor representa a média de dois pontos de dados. O anticorpo de controle negativo é uma IgG1 híbrida.

	IGF-IR DELFIA - IC_{50} (nM)		IR DELFIA - IC_{50} (nM)	
Anticorpo	Placa A	Placa B	Placa A	Placa B
H0L0	0,25	0,19	>133nM	>133nM
6E11	0,18	0,16	>133nM	>133nM
Controle Negativo	>133nM	>133nM	>133nM	>133nM

Exemplo 14 - ELISA de competição

20 Placas de ELISA foram revestidas com um anticorpo antagonístico anti-IGF-1R de humano (MAB391, R&D Systems) a $2\mu\text{g/ml}$ e bloqueadas com 4%BSA/PBS. IGF-1R recombinante de humano etiquetado com Poli-His (R&D Systems #305-GR) foi adicionado a 400ng/ml na presença de anticorpos monoclonais purificados e incubado por 1 hora na

temperatura ambiente. A placa foi lavada em TBST (TBS+Tween 20 0,1%) antes da adição de anticorpo anti-poli-his marcado com HRP (Sigma A7058-1VC) a 12-30µg/ml. A placa foi incubada por 1 hora antes de lavagem adicional e revelada com substrato OPD (Sigma P9187). A reação foi interrompida pela adição de Ácido Sulfúrico 2M e a absorbância foi medida a 490nm.

Figura 11A mostra um exemplo da atividade de vários anticorpos monoclonais murinos purificados no ELISA de competição. Dados dispostos para experimentos realizados ao mesmo tempo.

Figura 11B mostra um exemplo da atividade de H1LO no ELISA de competição em comparação com o 6E11 químera (6E11c). Dados dispostos para experimentos realizados ao mesmo tempo.

Figura 12A mostra um exemplo da atividade de vários anticorpos humanizados purificados no ELISA de competição em comparação com o anticorpo murino parental (6E11) e o anticorpo químera (6E11c). Em figura 12A, H0L0 e H0L0 IgG1m(AA) mostraram um sinal aumentado comparado com os ensaios de repetição mostrados em Figuras 12B e 12C.

Figura 12B-C mostra exemplos da atividade de vários anticorpos humanizados purificados no ELISA de competição.

Exemplo 15 - ELISA de ligação de IGF-1R de macaco cinomolgo

Placas de ELISA de 96 cavidades foram revestidas durante a noite com IGF-1R recombinante de macaco cinomolgo (veja Exemplo 4) a 1-2µg/ml e bloqueadas com 4%BSA/PBS. Anticorpos anti-hlGF-1R purificados foram adicionados e incubados por 1 hora na temperatura ambiente. As placas foram lavadas em TBST e Ig anti-camundongo conjugada com HRP (DAKO #P0260) foi adicionada em cada cavidade a 0,6-1,0 µg/ml. Placas foram incubadas por 1 hora na temperatura ambiente, lavadas com TBST e reveladas com substrato OPD (Sigma P9187) ou substrato TMB (Sigma T8665). A reação foi interrompida com Ácido Sulfúrico 2M e o nível de ligação foi

determinado por medição da absorbância a 490nm (para OPD) e 450nm (para TMB). Para anticorpos contendo uma região constante IgG1/C κ de humano, o anticorpo de detecção anti-Ig de camundongo conjugado com HRP foi substituído por anticorpo de cabra anti-cadeias leves Kappa de humano conjugado com peroxidase (Sigma, A7164).

Figura 13A mostra um exemplo de anticorpos monoclonais murinos purificados ligando em IGF-1R recombinante de macaco cinomolgo. Dados dispostos para experimentos realizados ao mesmo tempo.

Figura 13B mostra um exemplo de anticorpos monoclonais humanizados purificados ligando em IGF-1R recombinante de macaco cinomolgo em comparação com a quimera 6E11 (6E11c).

Exemplo 16 - ELISA de ligação de receptor de insulina

Placas de ELISA de 96 cavidades foram revestidas durante a noite com Receptor de Insulina Recombinante de humano (R&D Systems 1544-IR) a 0,5 μ g/ml e bloqueadas com 4%BSA/PBS. Anticorpos anti-hlGF-1R purificados ou anticorpo de camundongo anti-Receptor de Insulina de humano (R&D Systems MAB15441) foram adicionados nas placas e incubados por 1 hora na temperatura ambiente antes de lavagem com TBST. Anticorpo anti- Ig de camundongo conjugado com HRP (DAKO #P0260) foi adicionada em cada cavidade a 1/500 ou 1/2000 em 4%BSA/PBS e as placas foram incubadas por 1 hora. Placas foram lavadas e reveladas pela adição de substrato TMB (Sigma T8665) ou OPD (Sigma P9187). A reação foi interrompida com Ácido Sulfúrico 2M e a ligação foi detectada por medição de absorbância a 450nm ou 490nm. Para a detecção de anticorpos contendo uma região constante IgG1/C κ de humano, o anticorpo de detecção listado acima (anti-Ig de camundongo conjugado com HRP) foi substituído por anticorpo de cabra anti-cadeias leves Kappa de humano conjugado com peroxidase (Sigma, A7164).

Figura 14 mostra um exemplo de ELISA de ligação de

receptor de insulina usando anticorpos monoclonais murinos purificados. Em contraste com o anticorpo de controle positivo (R&D Systems MAB15441), anticorpos purificados 6E11, 5G4 e 15D9 não mostraram ligação no receptor de insulina em concentrações de até 10µg/ml. Dados dispostos para experimentos.

Em um experimento diferente, o perfil de ligação de receptor de insulina de vários anticorpos humanizados foi testado usando uma metodologia similar. Embora um anticorpo de controle positivo (R&D systems AF1544) mostrasse ligação boa, não houve ligação detectável dos anticorpos humanizados em receptor de insulina recombinante em concentrações de até 50µg/ml (Figura 15).

Exemplo 17 - Determinação de cinética de ligação

A cinética de ligação de anticorpos anti-IGF-1R para IGF-1R de humano foi avaliada usando o sistema Biacore™. A análise de cinética foi realizada usando um método de captura de anticorpo. Resumidamente, um anticorpo anti-IgG de camundongo Biacore, número em catálogo BR-1005-14) foi usado para análise de anticorpos parentais de camundongo e Proteína A, para anticorpos humanizados. Qualquer um de o anticorpo anti-camundongo ou a Proteína A foi imobilizado em um chip CM5 Biosensor por copulação de amina primária de acordo com os protocolos padrão de Biacore™, utilizando o dispositivo Wizard de imobilização, inerente no programa de computador da máquina, (níveis de 3000-4000 unidades de ressonância (RU's) foram tipicamente imobilizados). Anticorpos anti-IGF-1R foram então capturados quer diretamente de sobrenadantes de hibridoma quer de material purificado. Os níveis de captura para sobrenadantes dependendo da concentração inicial do hibridoma e estas variaram entre 20RU's e 650RU's. Para o material purificado, o nível capturado para os anticorpos testados estiveram geralmente entre 20 e 600RU's. Após captura, a linha base foi permitida estabilizar antes que IGF-1R recombinante, material etiquetado

com histidina de R&D Systems (número em catálogo 305-GR) fosse então passado sobre a superfície em concentrações definidas (costumeiramente dentro da faixa de 0-256nM). Devido à afinidade alta de interação, tempos de dissociação de até uma hora foram usados. Regeneração foi por eluição com ácido usando quer ácido fosfórico 100mM quer Glicina 10mM, pH 1,5, a regeneração não afetou significativamente a capacidade da superfície em capturar o anticorpo para outra etapa de análise. As corridas foram realizadas ambos a 25 °C e 37°C. Os experimentos foram realizados em sistema T100 Biacore™, usando o controle T100 e programa de computador de análise. Os dados experimentais foram ajustados para o modelo 1:1 de ligação inerente em programa de computador de análise da máquina.

Tabelas 3 - 7 mostram uma série de experimentos conduzidos com material sobrenadante e purificado.

Tabela 3 - Dados cinéticos para uma seleção de monoclonais de IGF-1R murinos purificados a 25°C e 37°C

Anticorpo	Afinidade(nM) 25°C (Corrida 1-T0011 R6)	Afinidade(nM) 37°C (Corrida 2-T0011 R4)	Afinidade(nM) 25°C (Corrida 3-T0022 R5)
6E11	0,09	0,164	0,14
5G4	3,0	5,9	Não testado
15D9	0,233	0,558	Não testado

Tabela 4 - Dados cinéticos para material sobrenadante de um H1L0 e H0L0 em comparação com 6E11 c. A corrida (T0037 R3) foi realizada a 37°C.

Anticorpos	<i>K_a</i>	<i>K_d</i>	KD(nM)
H1L0	7,56e4	3,52e-5	0,47
6E11c Sobrenadante	8,14e4	3,13e-5	0,38
6E11c Purificado	8,52e4	3,32e-5	0,39

Tabela 5 - Dados cinéticos para material sobrenadante H0L0 e H0L0 IgG1 m(AA) e H1L0 e H10L0 IgG1m(AA) em comparação com 6E11c. A corrida (T0040 R2) foi realizada a 37°C.

Corrida 1

Anticorpos	<i>K_a</i>	<i>K_d</i>	KD(nM)
H1L0 (sobrenadante)	7,56e4	3,52e-5	0,47
6E11c (sobrenadante)	8,14e4	3,13e-5	0,38
6E11c (purificado)	8,52e4	3,32e-5	0,39

Corrida 2

Anticorpos	Ka	Kd	KD (nM)
H1L0 (sobrenadante)	6,82e4	4,28e-5	0,63
6E11c (purificado)	7,59e4	3,25e-5	0,43

(sobrenadantes H1L0 são os mesmos para corridas 1 e 2, contudo os 6E11c purificados são bateladas diferentes)

Tabela 6 - Dados cinéticos para H0L0 e H1L0 purificado em comparação com a quimera 6E11 (6E11c). A corrida (T0041 R1) foi realizada a 37°C.

Anticorpos	Ka	Kd	KD(nM)
H0L0	6,24e4	3,93e-5	0,63
H1L0	6,54e4	2,95e-5	0,45
6E11c	6,60e4	2,45e-5	0,37

Tabela 7 - Dados cinéticos para H0L0 e H0L0 IgG1m(AA) e H1L0 e H10L0 IgG1m(AA) purificado em comparação com a quimera 6E11 (6E11c). Três corridas independentes foram realizadas a 37°C.

Anticorpo	Corrida 1 - T0044 R3			Corrida 2 - T0044 R4			Corrida 3 - T0044 R6		
	Ka	Kd	KD (nM)	Ka	Kd	KD (nM)	Ka	Kd	KD (nM)
H0L0	5,13e4	2,68e-5	0,52	6,62e4	3,97e-5	0,59	6,17e4	5,56e-5	0,90
H0L0 IgG1m(AA)	5,40e4	2,67e-5	0,49	7,68e4	4,00e-5	0,52	7,38e4	5,71e-5	0,77
H1L0	4,97e4	2,09e-5	0,42	6,67e4	3,47e-5	0,52	7,04e4	4,18e-5	0,59
H1L0 IgG1m(AA)	5,07e4	2,17e-5	0,43	6,61e4	3,22e-5	0,49	6,48e4	4,44e-5	0,69
6E11c	3,99e4	8,71e-6	0,22	6,78e4	2,29e-5	0,34	6,75e4	4,02e-5	0,60

Em um experimento diferente a seguinte abordagem foi usada. Proteína A foi imobilizada sobre uma superfície CM5 por copulação de amina primária de acordo com os protocolos padrão de fabricantes. Anticorpos contra IGF-1R foram capturados sobre esta superfície e após um período de estabilização IGF-1R recombinante de humano ou cinomolgo foi injetado sobre esta superfície capturada. Geralmente, as concentrações de IGF-1R usadas foram 256-16nM, com uma injeção de 0nM (apenas tampão) também usada para referência dupla de acordo com a melhor prática para análise cinética Biacore. Dados foram analisados usando o modelo 1:1 inerente à máquina Biacore, o trabalho foi realizado em T100 usando tampão de corrida HBS-EP a 37°C. Os resultados confirmam que as variantes humanizadas H0L0 e H0L0 IgG1m(AA) mostram afinidade de ligação alta (-300-600pM) em IGF-1R recombinante de humano e de macaco cinomolgo e cinética comparável com a quimera 6E11.

Tabela 8 Cinética de anticorpos anti-IGF-1R versus IGF-1R recombinante de humano e IGF-1R de macaco cinomolgo a 37°C. Dados mostrados são de um único experimento.

	IGF-1R de humano			IGF-1R de macaco cinomolgo		
	ka	Kd	KD(nM)	ka	Kd	KD (nM)
6E11 quimera	1,22e5	2,61e-5	0,21	1,10e5	2,14e-5	0,19
H0L0	1,07e5	2,73e-5	0,25	9,18e4	2,56e-5	0,28
H0L0	1,14e5	3,20e-5	0,28	1,07e5	2,73e-5	0,25
IgGlm(AA)						

Tem sido realizado um experimento que confirma que H0L0, H0L0 IgG1m(AA) e 6E11 quimera mostram cinéticas comparáveis de ligação. Contudo a afinidade total foi menor do que a vista em todos os experimentos prévios (a 1,88, 1,84 e 1,52nM respectivamente). Os motivos para a diferença evidente são desconhecidos.

Exemplo 18 - Inibição de ligação de ligante determinada usando Biacore

O experimento foi realizado usando duas densidades diferentes de IGF-I biotinilado capturado. Resumidamente qualquer 200 ou 4000 RU's foi estavelmente capturado em um chip sensor de estreptavidina. Para testar a capacidade de neutralização de anticorpos anti-IGF-1R, concentrações diferentes de anticorpos foram pré-misturadas com uma concentração fixa de IGF-1R recombinante. Como um controle IGF-1 não biotinilado também foi misturado com a mesma concentração de IGF-1R. Esta mistura foi então passada sobre a superfície de IGF-I e o ponto de associação máxima foi medido. Esta leitura foi então comparada com uma amostra com a mesma concentração de IGF-1R etiquetado com his na ausência de anticorpos anti-IGF-1R. A presença de um anticorpo neutralizador bloqueou a ligação de IGF-1R em IGF-I e reduziu a associação máxima observada. Inibição percentual foi calculada por comparação dos valores. Regeneração foi realizada usando dois pulsos de cloreto de magnésio 4M. Os experimentos foram realizados em um sistema Biacore 3000.

Tabelas 9 e 10 abaixo mostram a inibição percentual obtida e

também detalhe das concentrações de anticorpos, IGF-1 e IGF-1R usados para obter estes resultados.

Tabela 9 - Valores de inibição para a superfície 200 RU's IGF-1

Complexo de Anticorpo + IGF-1R	Inibição %
IGF1 (125nM) + His IGF-1R (25nM)	69
IGF1 (500nM) + His IGF-1R (25nM)	89
6E11 (125nM) + His IGF-1R (25nM)	48
6E11 (500nM) + His IGF-1R (25nM)	50

Tabela 10 - Valores de inibição para a Superfície 4000 RU's IGF-1

Complexo de Anticorpo + IGF-1R	Inibição %
IGF1 (5µM) + His IGF-1R (50nM)	93
IGF1 (500nM) + His IGF-1R (50nM)	86
6E11 (500nM) + His IGF-1R (50nM)	48

5 Em um experimento diferente, a capacidade dos anticorpos humanizados em diretamente bloquear ligação de ligante foi avaliada usando uma metodologia baseada em Biacore usando ligante biotinilado capturado (IGF-I, IGF-2). IGF-1 ou IGF-2 biotinilado foi imobilizado sobre chip biossensor de estreptavidina para cerca de 300RUs e 350RUs respectivamente.

10 IGF-1R foi passado sobre a superfície a 50nM sozinho ou a 50nM em uma solução pré-misturada contendo quer 250nM de anticorpos anti-IGF-1R (para os experimentos de IGF-I) quer 500nM de anticorpos anti-IGF-1R (para o experimento de IGF-2). Ligação de IGF-1R também foi realizada na presença dos ligantes naturais IGF-1 e IGF-2 (ambos não-biotinilados). A superfície foi

15 regenerada usando ácido fosfórico 100mM. Os experimentos foram realizados usando tampão HBS-EP a 25°C no Biacore 3000. Nota: a análise dos dados de ensaio de IGF-2 foi complicada pelo fato de que alguns dos anticorpos mostraram ligação não-específica na superfície de IGF-2 sozinha. Para IGF-I imobilizado, o inibidor mais eficiente da ligação de receptor foi IGF-I não-

20 marcado, com IGF-2 e H0L0 mostrando inibição de cerca de 60% (Tabela 11). Para IGF-2 imobilizado, o inibidor mais eficiente da ligação de receptor foi IGF-I ou IGF-2 não-marcado. Neste ensaio, os anticorpos neutralizadores, incluindo H0L0 mostraram inibição parcial de ligação de IGF-2 (Tabela 11).

Tabela 11 - Neutralização da ligação de receptor em ligante

Amostra	Neutralização % de ligação de receptor em IGF-1	Neutralização % de ligação de receptor em IGF-2
H0L0	60	37
H0L0 IgG1m(AA)	58	17
6E11 Quimera	44	20
IGF-1	87	98
IGF-2	68	92

Exemplo 19 - Análise de separação de célula ativada por fluorescência (FACS)

Células Colo205 (2×10^7 células/ml) foram coradas com anticorpos purificados anti MGF-1R a $10 \mu\text{g/ml}$ por 1 hora em tampão FACS (FCS 4% em PBS). Células também foram coradas em um anticorpo de controle de camundongo negativo adequado (Sigma #15154). Células foram lavadas em tampão FACS e então coradas com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo - PE 1:100 (Sigma P8547). Após lavagem em tampão FACS e fixação em Cell Fix (Becton Dickinson) as células foram analisadas por Citometria de fluxo.

Figura 16 demonstra que o anticorpo 6E11 é capaz de reconhecer IGF-1R nativamente expressado sobre a superfície de uma linhagem de célula de tumor de humano.

Em um experimento diferente, os anticorpos humanizados foram testados para sua capacidade para corar várias linhagens de célula de humano que conhecidamente sobre-expressam IGF-1R. Células de carcinoma de pulmão NCI-H838 foram coradas com os anticorpos selecionados a $100 \mu\text{g/ml}$ por 45mins a 4°C . Ligação foi detectada com anticorpo anti-IgG de humano conjugado com PE (Sigma P8047). Amostras foram analisadas por Citometria de fluxo usando um Becton Dickinson FACscan Citometer. Os resultados mostrados em Figura 17 confirmam que as variantes humanizadas podem ligar em NCI-H838. Um resultado similar tem sido obtido para células de carcinoma de mama MCF7 e células de carcinoma de pulmão A549 (Figura 18).

Exemplo 20 - Imuno-histoquímica em seções de tecido congelado

Tecidos foram seccionados em lâminas de vidro, fixados com acetona por 2 minutos e então carregados para dentro de um corador de lâmina automático (DakoCitomation S3400). Lâminas foram bloqueadas e coradas com anticorpos murinos (anticorpo primário) e um anticorpo secundário anti-Ig de camundongo - HRP (DakoCitomation Envision Kit) usando métodos de coloração imunoquímica padrão. Após esta incubação secundária, as lâminas foram lavadas e reveladas usando a solução DakoCitomation Envision DAB, enxaguadas e cobertas com lamínula para visualização. Um anticorpo de controle irrelevante (IgG1 de camundongo purificado de um hibridoma MOPC21) foi usado como um controle negativo.

Os anticorpos quimérico e humanizado foram analisados em uma maneira similar exceto que estes anticorpos foram biotinilados para facilitar detecção. Contudo, foi verificado que a presença da etiqueta de biotina diminui a atividade destes anticorpos determinada por ELISA (dados não mostrados), portanto a concentração de anticorpo primário usada foi aumentada para até 100µg/ml. O anticorpo secundário listado acima (DakoCitomation Envision Kit - Anti-Ig de camundongo conjugado com HRP) foi substituído por estreptavidina-HRP, (DakoCitomation Cat# 1016). Um anticorpo irrelevante alternativo também foi biotinilado e usado como um controle negativo (Sigma #15154).

As amostras foram analisadas como segue. Após calibração do instrumento usando o suporte de calibração (#69935000, 05041103097), as lâminas foram carregadas no sistema de imagem celular automático ChromaVison e escaneadas a 10X. Análise de dados foi realizada para calcular a coloração de tecido % (definida como marrom/marrom+azul*100).

Figura 19 e 20 mostram que 6E11 colore amostras de tecido de tumor de humano. Um anticorpo de controle positivo foi incluído como uma referência (Abeam, #4065).

Figura 21 mostra que quimera 6E11 (6E11c) e H1L0 colorem

amostras de tecido de tumor de humano.

Em um experimento separado, H0L0 humanizado foi testado para sua capacidade para reconhecer IGF-1R de humano em amostras de tecido de tumor de humano usando um microarranjo de tecido congelado obtido de Citomyxx (arranjo ID: MB-1002). Este arranjo contém 10 cores de tumor de pulmão, 10 cores de tumor de mama, 10 cores de tumor de cólon e 10 cores de tumor de próstata. H0L0 foi biotinilado para facilitar detecção. Uma lâmina de microarranjo congelado (Citomyxx MB-1002) foi fixada com uma solução a 4°C de acetona/etanol (50:50), por 5 minutos, lavada e então tratada com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos para remover alguma peroxidase endógena. As lâminas foram coradas com H0L0 biotinilado anti-IGF-1R a 7,0µg/ml por 1 hora na temperatura ambiente. Após lavagem, uma estreptavidina peroxidase foi aplicada por 20 minutos e visualizada com DAB (diamino-benzidina) por 2 minutos. Finalmente, as seções foram lavadas e contra-coradas em hematoxilina de Mayer, enxaguadas em água de torneira, desidratadas, clareadas e montadas. As amostras de tumor são as seguintes: Pulmão (Painel Direito: tumor de célula escamosa, Painel Esquerdo: Adenocarcinoma; Mama (Painel Direito: Adenocarcinoma, epitélio dutal, Painel Esquerdo: Adenocarcinoma, invasivo); Cólon (Painel Direito: Adenocarcinoma bem diferenciado, Painel Esquerdo: Adenocarcinoma bem diferenciado; Próstata (Painel Direito: Adenocarcinoma, Painel Esquerdo: Adenocarcinoma). Os resultados confirmam que H0L0 mostrou coloração moderada/forte das seções viáveis como resumido em Tabela 12 abaixo. Imagens representativas de alta capacidade de aumento (200x) dos tumores de pulmão, mama, cólon e próstata são mostradas em Figura 22, confirmando que o anticorpo H0L0 biotinilado predominantemente cora células epiteliais.

Tabela 12- Sumário de análise de imuno-histoquímica de microarranjo de

tecido de tumor

Tipo de tumor	Coloração positiva (moderada/forte)	Sem coloração	Amostra perdida
Pulmão	4	3	3
Mama	7	3	0
Cólon	6	3	1
Próstata	6	0	4

Exemplo 21 - Inibição de sinalização de AKT

Placas Costar de 96 cavidades (#3598) foram revestidas com 50 µl de Gelatina 2% em PBS e incubadas em uma incubadora a 37°C por pelo menos uma hora. Antes do uso, as placas foram enxaguadas uma vez com PBS. Pré-adipócitos de humano foram tripsinizados, centrifugados e o meio foi sifonado. As células foram ressuspensas com 10 mL de meio de crescimento de Pré-Adipócito aquecido (ZenBio, #PM-1). Densidade de células foi ajustada para 150.000 células por mL de Meio de crescimento de Pré-Adipócito (ZenBio). Dois frascos T225 Costar contendo 50ml de meio foram cada um semeados com 1 milhão de células. As células restantes foram usadas para semear as placas de 96 cavidades revestidas com Gelatina (100µl = 15.000 células por cavidade) usando um Multidrop384 ou instrumento similar. As células foram incubadas durante a noite a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 90%. No dia seguinte, o meio foi removido, 200 µl de meio de Indução foram adicionados e as placas foram cobertas com filme permeável a gás Breath-Easy (Sigma#Z380059). As placas foram incubadas por 6 dias a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 90%. Após 6 dias, o meio foi aspirado e 200 µl de Meio de Diferenciação foram adicionados. as placas foram cobertas com filme permeável a gás Breath-Easy e incubadas por 7 dias a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 90%. Após a diferenciação das células, o meio foi aspirado e as células enxaguadas mais uma vez com 200 µl de PBS. 75 µl de Meio Adipocyte Starve foram adicionados e as placas foram cobertas durante a noite a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, umidade de 90%. Amostras de teste foram diluídas em Meio

Adipocyte Starve a 4X a concentração final. 25 µl de composto de teste diluído foram adicionados em cada cavidade e incubados a 37°C por 1 hora. Ligante IGF-I (R&D Systems, #291-G1) foi diluído para 30 nM em Meio Adipocyte Starve e 20µL de IGF-I 30nM foram adicionados em cada
5 cavidade (concentração final de 5 nM). As placas foram incubadas a 37°C por precisamente 5 min após os quais o sobrenadante foi removido por remoção rápida do meio para dentro de uma pia. As placas foram secas sobre toalhas de papel.

65 µl de tampão de Lise Completo (tampão de Lise MSD
10 contendo inibidores de fosfatase e protease) foram adicionados em cada cavidade e a placa foi vedada com um vedador de placa aquecido. As placas foram quer armazenadas a -80°C (para análise posterior) ou deixadas sobre um agitador (aprox. 500 rpm) por 15 min na temperatura ambiente antes do ensaio MSD.

15 Níveis de AKT fosforilado (pSer473) foram avaliados usando o kit de ensaio de fosforilação MSD (#K111CAD). Resumidamente, 150 µl por cavidade de solução de Bloqueio (MSD Blocker A dissolvido em Tampão de Lavagem MSD Tris) foram adicionados em cada cavidade de uma placa de Ensaio MSD. A placa foi vedada e posta sobre um agitador a 300 rpm usando
20 um agitador de placa de topo de bancada por 1 hora na temperatura ambiente. A solução de Bloqueador foi removida da(s) placa(s) MSD e as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µl/cavidade de 1x Tampão de lavagem MSD Tris. 50µl/cavidade de lisado de células da(s) placa(s) de células foram transferidos para a cavidade correspondente da(s) placa(s) MSD e vedados.
25 As placas foram agitadas a 300 rpm usando um agitador de placa de topo de bancada por 1 hora na temperatura ambiente. As placas MSD foram lavadas quatro vezes com 200 µl por cavidade usando 1x tampão de lavagem MSD (ELx405).

25 µl de mistura de anticorpo de detecção diluída

(concentração final de 10 nM) foram adicionados em cada cavidade da(s) placa(s) MSD. As placas foram agitadas a 300 rpm usando um agitador de placa de topo de bancada por 1 hora na temperatura ambiente e então lavadas quatro vezes com 200 µl por cavidade usando 1x tampão de lavagem MSD Tris (ELx405). 150 mL de Read Buffer T com tensoativo foram adicionados em cada cavidade e as placas foram lidas com leitora MSD 6000 SECTOR. Embora a intensidade de sinal diminuísse com o tempo em Read Buffer, a janela de sinal tipicamente permaneceu estável por aproximadamente 20-30 minutos.

10 A Tabela 13 mostra um sumário dos dados de três placas independentes e indica que Mabs parental murino, quimérico e humanizado purificados inibem indução mediada por IGF-I de fosforilação de AKT. Placas 1 e 2 foram corridas em paralelo. Placa 3 foi corrida em um dia separado. Os valores são representados como pIC_{50} ($= -\log_{10}(IC_{50})$ em g/ml)

15 Tabela 13 - Atividade de vários anticorpos purificados no ensaio de fosforilação de AKT

Anticorpo	Placa 1	Placa 2	Placa 3
6E11 parental	7,75	7,79	7,67
H0L0	7,65	7,76	7,34
H1L0	7,62	7,68	7,30
6E11c	7,59	7,32	7,34
Controle negativo	6,05	6,25	<5,82

Em dois experimentos diferentes, vários anticorpos humanizados foram testados para inibição de fosforilação de AKT em resposta à estimulação de IGF-I ou insulina. Para resultados de IGF-I mostrados em Tabela 14, os valores são representados como pIC_{50} médios onde $pIC_{50} = -\log_{10}(IC_{50})$ em g/ml. V_{max} é a inibição máxima expressada como uma percentagem do sinal na ausência de ligante. Experimento 1 é a média de 4 corridas. Experimento 2 é a média de 3 corridas. Experimentos 1 e 2 foram corridos aproximadamente 6 meses separadamente. Para alguns anticorpos (**H0L0), bateladas diferentes de material foram testadas em paralelo. Em comparação com o anticorpo de

controle negativo. Todos os anticorpos anti-IGF-1R mostraram uma inibição dependente de dose da fosforilação de AKT com o anticorpo humanizado H0L0 mostrando atividade comparável a do anticorpo parental de camundongo 6E11 ou do anticorpo quimérico 6E11 (Tabela 14).

Tabela 14 - Atividade de vários anticorpos purificados no ensaio de fosforilação de AKT.

Anticorpo	Experimento 1				Experimento 2			
	Média (g/ml) +/- DP	pIC ₅₀	Média (g/ml) +/- DP	V _{max}	Média (g/ml) +/- DP	pIC ₅₀	Média (g/ml) +/- DP	V _{max}
6E11 parental	ND		ND		7,58 (0,17)		113 (2,6)	
H0L0**	7,33 (0,11)		107(9,5)		7,42(0,14)**		106(3,6)	100
H1L0	7,24 (0,14)		116 (11,0)		7,53(0,15)**		(7,9)	
IgGlm(AA)					ND		ND	
6E11 quimera	7,34 (0,08)		114 (14,1)		ND		ND	
IR3	7,17 (0,15)		105 (7,0)		7,45 (0,07)		108 (10,6)	
Controle negativo	7,17 (0,30)		57,2 (9,4)		7,30 (0,89)		52(1,2)	

Visto que o sistema de ensaio também foi sensível à fosforilação de AKT mediada por insulina (via o receptor de insulina), o efeito dos anticorpos humanizados sobre a sinalização de insulina foi avaliado em paralelo aos experimentos de IGF-I descritos acima. Em contraste aos resultados com estimulação por IGF-I, os anticorpos humanizados não mostraram inibição de sinalização de receptor de insulina sobre e acima dos efeitos não específicos observados com os anticorpos de controle negativo (dados não mostrados). Estes resultados são observados em dois experimentos independentes (sete corridas no total).

Exemplo 22 - Ensaio de proliferação com células MCF7

Células MCF-7 (ATCC HBT-22) foram semeadas em placas de 96 cavidades em uma densidade de 10000 células/cavidade e crescidas por 2 dias em meio completo (MEM+sais Earles + 10% FCS + 0,1mg/ml de insulina bovina (Sigma 10516)). Células foram lavadas e incubadas em MEM

livre de soro (sem soro, sem insulina) por 4 horas. Meio foi removido e reposto com uma faixa de concentrações de anticorpos purificados (0,014 - 10µg/ml) diluídas em meio livre de soro (100µl/cavidade). As células foram incubadas por 1 hora antes da adição ulterior de IGF-I (R&D Systems #291-G1) para uma concentração final de 50ng/ml. Todos os tratamentos foram realizados três vezes. As células foram incubadas por 5 dias a 37°C, 5% CO₂. Após incubação, 15µl de solução de corante MTT (Promega #G402A) foram adicionados em cada cavidade e as placas foram incubadas por mais 4 horas. 100µl de solução Interrupção/Solubilização (Promega #G401 A) foram adicionados em cada cavidade e a placa foi agitada suavemente durante a noite na temperatura ambiente. No dia seguinte o nível de proliferação foi determinado por medição da absorbância a 570nm usando uma leitora de placa.

Figura 23 mostra a atividade de vários anticorpos monoclonais de camundongo purificados para inibir a proliferação de células de tumor. Dados dispostos para experimentos.

Exemplo 23 - Ensaio de proliferação - células LISN

Células LISN (3T3 hIGF-1R) foram semeadas em placas brancas de 96 cavidades (Corning 3610) em uma densidade de 10.000 células/cavidade e crescidas por 1 dia em meio completo (modificação de DMEM-Hepes + 10% FCS). O meio foi removido e as células foram incubadas em DMEM livre de soro por 4 horas. Meio foi removido e reposto com uma faixa de concentrações (0,0041 - 3µg/ml de concentração final) de anticorpos purificados diluídos em meio livre de soro (50µl/cavidade). As células foram incubadas por 1 hora antes da adição ulterior de 50µl/cavidade de IGF-1 (R&D Systems 291-G1 ou IGF-I - veja Exemplos 5 e 6) para uma concentração final de 50-60ng/ml. Todos os tratamentos foram realizados três vezes. As células foram incubadas por 0-3 dias a 37°C, 5% CO₂. Após incubação, 100µl de reagente recém-preparado Promega CellTitre-Glo

(Promega G7571) foram adicionados em cada cavidade e as placas foram agitadas por 2 min. A placa foi adicionalmente incubada na temperatura ambiente por 10 min para permitir estabilização de sinal antes da medição do sinal de luminescência com uma leitora de placa Wallac Victor.

5 Figura 24 e 25 A-E mostram a atividade de anticorpo monoclonal murino purificado 6E11, 6E11c H0L0 e H0L0 IgG1m(AA) e H1L0 e H1L0 IgG1m(AA). Os dados confirmam que os H0L0 e H1L0 podem inibir proliferação de célula de tumor in vitro. Dados dispostos para experimentos

10 Exemplo 24 - Inibição de ciclo celular

Células NCI-H838 (ATCC CRL-5844) foram semeadas para dentro de microplacas de 24 cavidades em uma densidade de 2×10^5 células/cavidade e crescidas durante a noite em 1 ml de RPMI completo (RPMI+10%FCS). No dia seguinte as células foram lavadas com SFM (meio
15 RPMI livre de soro) e incubadas em 1 mL de mesmo meio por 4 horas. O meio foi aspirado das células e 500 µl de SFM contendo 20µg/ml de anticorpos purificados foram adicionados (concentração final 10µg/ml). As células foram incubadas por 1 hora. Em algumas cavidades, IGF-I (R&D Systems 291-G1) em SFM foi adicionado para uma concentração final de
20 50ng/ml. As células tratadas foram incubadas durante a noite. No dia seguinte as células foram lavadas suavemente em PBS e então colhidas pela adição de 200 µl de solução Versene (Invitrogen #15040). As suspensões de célula foram transferidas para uma placa de fundo-V de 96 cavidades. Após pelotização das células por centrifugação elas foram fixadas pela adição de
25 Etanol 80% gelado e incubação sobre gelo por 30min. As células foram pelotizadas e ressuspensas em 200 µl de Iodeto de Propídio 50µg/ml, EDTA 0,1 mM, Triton X-100 0,1%, RNase A 0,05mg/ml. As células foram incubadas sobre gelo no escuro até serem analisadas por Citometria de fluxo.

Figura 26. mostra o estado do ciclo celular de vários grupos de

tratamento na presença de IGF-I, as células são induzidas para passar por um ciclo. Na presença de anticorpo 6E11, o ciclo celular foi inibido em níveis comparáveis com aquele de células incubadas na ausência de IGF-I.

Exemplo 25 - Proteção contra apoptose

5 Uma microplaca de 96 cavidades foi semeada com células NCI-H838 (ATCC CRL-5844) em uma densidade de 10.000 células/cavidade em 100µl de meio RPMI completo e crescidas por 2 dias. As células foram então lavadas em SFM (RPMI sem soro) e incubadas em 100µl de SFM por 4-5 horas. O meio foi removido antes do tratamento com quer nenhum
10 anticorpo, um anticorpo de controle negativo, quer um anticorpo purificado (6E11) anti-hlGF-1R a 20µg/ml. As células foram adicionalmente tratadas com quer SFM sozinho, SFM + IGF-1 a 20ng/ml, SFM + Camptotecina a 5µM quer SFM + Camptotecina a 5µM + IGF-1 a 20ng/ml. Todos os tratamentos foram testados três vezes em um volume final de 100µl. A placa
15 foi então incubada por 20 horas. O meio foi aspirado das cavidades e as células foram lisadas pela adição de 200 µl de NP-40 0,5% em PBS seguido por incubação de 5 min com agitação na temperatura ambiente. 20µl de lisado foram transferidos para uma microplaca preparada do kit Roche Cell Death ELISA e 80µl de tampão de incubação foram adicionados. O protocolo
20 descrito neste inserto de kit (Roche, Número em Catálogo: 1.544.675) foi seguido e a absorbância a 405nm foi medida usando uma leitora de placa.

Figura 27 mostra que a presença de IGF-I concede às células NCI-H838 alguma proteção contra apoptose induzida por camptotecina. A adição de 6E11 reverteu a proteção mediada por IGF-1 contra apoptose.

25 Em um experimento diferente, anticorpos selecionados foram testados para sua capacidade para prevenir salvamento de IGF-1 da apoptose induzida por camptotecina em células A549. Células A549 foram plaqueadas a 1×10^4 , crescidas em placas de 96 cavidades e tratadas com 20 µg/ml de anticorpos selecionados em condições livre de soro por 1 hora. IGF-1 a

15ng/ml e Camptotecina a 5µg/ml foram adicionados juntos e as células foram incubadas durante a noite. O nível de apoptose foi medido usando um kit Roche Cell Death Detection ELISA (Roche 11774425001) que estima o nível relativo de fragmentação de DNA. Como mostrado em Figura 28, todos os anticorpos humanizados preveniram o salvamento de IGF-1 da apoptose induzida por camptotecina.

Exemplo 26 - Ausência de agonismo na presença ou ausência de anticorpos de ligação cruzada

Microplacas de 96 cavidades foram semeadas com células 3T3/LISN c4 em uma densidade de 10.000 células/cavidade em DMEM completo (modificação de DMEM Hepes + 10%FCS) e crescidas por 2 dias. Anticorpos purificados anti IGF-1R foram titulados sobre as células em DMEM completo, cada diluição sendo testada três vezes. Um anticorpo relatado em ter atividade agonística (#556000, BD Biosciences) e/ou 50ng/ml de IGF-I (incubado por 20-30 min) foram incluídos em alguns experimentos como um controle positivo. Controles negativos de anticorpo irrelevante e meio sozinho foram incluídos. Em outros experimentos, um anticorpo de ligação cruzada anti-camundongo (Sigma M8144) ou um anticorpo de ligação cruzada anti-humano (Sigma I3382) foram incluídos na titulação de anticorpo em uma razão de 2:1 [Ab anti IGF-I]:[Ab de ligação cruzada]. Placas foram incubadas por 30 min. Meio foi aspirado e as células foram lavadas suavemente com PBS uma vez antes de serem lisadas com tampão de lise RIPA (NaCl 150mM, TrisHCl 50mM, Desoxicolato de Na 6mM, Tween 20 1%) mais coquetel inibidor de protease I (Roche 11.697.498.001). A placa foi deixada a -20°C durante a noite. Após descongelamento amostras de 100 µl de lisado foram transferidas para uma placa ELISA de 96 cavidades pré-revestida com um anticorpo de captura anti IGF-1R (2B9) a 2µg/ml e bloqueado com 4%BSA/TBS. A placa foi incubada durante a noite a 4°C. A placa foi lavada 4 vezes com TBST (TBS+Tween 20 0,1%) e um anticorpo

anti-Fosfotirosina marcado com Európio (DELFIA Eu-N1 PT66, PerkinElmer) diluído 1/2500 em 4%BSA/TBS foi adicionado em cada cavidade. Após incubação de 1 hora a placa foi lavada como antes e 100 µl de solução DELFIA Enhancement (PerkinElmer 1244-105) foram adicionados.

- 5 Após incubação de 10 min o nível de fosforilação de receptor foi determinado usando uma leitora de placa ajustada para medir fluorescência resolvida por tempo (TRF) de Európio.

Figura 29. mostra que 6E11 não teve atividade agonística em concentrações de até 10µg/ml na presença de anticorpos de ligação cruzada.

- 10 Dados dispostos para experimentos.

Em um experimento diferente, o sistema de ensaio de pré-adipócito foi usado para determinar se a série-6E11 de anticorpos anti-IGF-1R purificados modula os níveis basais de fosfo-AKT que pode indicar propriedades agonísticas. Neste experimento, os pré-adipócitos foram diferenciado e tratados como descrito em exemplo 21. Contudo, a etapa de estimulação foi removida com o propósito de avaliar o nível basal de fosforilação de AKT na presença de anticorpo humanizado. Os resultados mostram que os anticorpos humanizados em concentrações de até 20µg/ml, não houve aumento em fosforilação de AKY basal (Figura 30).

- 20 Em um conjunto paralelo de experimentos usando a linhagem celular de carcinoma de pulmão A549, os níveis basais de fosforilação de AKT foram avaliados na presença de 0-20µg/ml de anticorpo e na ausência de ligante. Duas bateladas diferentes de H0L0, uma amostra de controle negativo e 11C11 (um anticorpo que mostra ativação moderada da fosforilação de receptor, veja Figura 31). O eixo-y- mostra níveis de fosforilação de AKT em unidades arbitrárias. Consistente com os dados apresentados em exemplo 21, fosforilação de Akt mediada por IGF-I inibida por H0L0 em uma maneira dependente de dose (com IC₅₀s dentro da faixa de 200-500ng/ml, dados não mostrados). Contudo, parece que concentrações crescentes de anticorpo na
- 25

ausência de ligante causam um aumento pequeno do nível basal de fosfo-Akt. Contudo, o sinal aparece como um platô e alcança não mais do que 3 vezes os níveis latentes com duas bateladas diferentes de material. O motivo para o aumento pequeno em sinal é desconhecido e estes dados não são confirmados por quaisquer outros dados experimentais.

Em um conjunto paralelo de experimentos usando as células LISN-c4 3T3, os efeitos dos anticorpos humanizados sobre níveis basais de fosforilação de receptor foram avaliados na ausência de estimulação de ligante. Células de LISN foram incubadas na presença de anticorpos selecionados em uma faixa de concentrações (27ng/ml -20µg/ml) por 30min. Uma titulação de anticorpo agonísticos conhecidos 11C11 e BD556000 (Becton Dickinson) também foram incluídos. Cavidades de controle estimuladas com IGF-2 a 100ng/ml foram incluídas. Fosforilação de IGF-1R foi medida usando o ensaio DELFIA descrito previamente. Em contraste com dois anticorpos de controle positivo, 11C11 e BD556000, que induziram um aumento dependente de dose em fosforilação de receptor, os anticorpos humanizados não mostraram aumento nos níveis basais de receptor fosforilado (Figura 32). Visto que ligação cruzada de anticorpo ligado em superfície tem o potencial de induzir sinalização de receptor, o experimento foi repetido na presença de anticorpos de ligação cruzada. Células LISN foram incubadas com uma faixa de concentrações de anticorpos selecionados misturados com anticorpos de ligação cruzada apropriados em uma razão de 2:1 por 30min (Sigma I3382 para os anticorpos humanizados e Sigma M8144 para os anticorpos de camundongo). Fosforilação de IGF-1R foi medida usando o ensaio DELFIA previamente descrito. Os resultados mostram que em contraste com 11C11 que aumentou os níveis de receptor fosforilado, os anticorpos humanizados não mostraram aumento em níveis basais de receptor fosforilado (Figura 33).

Os efeito da adição de anticorpos humanizados sobre a

proliferação de ambas LISN-c4 e NCI-H929 (linhagem de célula de Linfoma Múltiplo de humano) na ausência de ligante também foram testados. Células NCI-H929 foram plaqueadas em uma placa de 96 cavidades a 4×10^4 células/cavidade em meio livre de soro. Diluições dos anticorpos selecionados foram adicionadas dentro da faixa de 20-0,019 μ g/ml. Células foram incubadas por 4 dias a 37°C antes de a proliferação ser medida usando um kit de ensaio Promega Cell Titre Blue (Promega G8081). Figura 34 mostra que H0L0 não estimula a proliferação de células NCI-H929 em meio livre de soro. Resultados similares foram observados com células LISN-C4 (dados não mostrados).

Exemplo 27 - Modelo de aloenxerto - 3T3/LISN c4

Um modelo de tumor in vivo usando células 3T3/LISN c4 foi usado para estabelecer a capacidade de anticorpo monoclonal murino 6E11 de inibir o crescimento de tumores pré-estabelecidos em camundongos nus atímicos. Tumores foram induzidos por métodos similares àqueles publicados em Cohen et al., Clinical Cancer Research 11:2063-2073 ((2005). Em resumo, $2,5 \times 10^6$ de células LISN suspensas e 0,1ml de Matrigel™ foram subcutaneamente inoculadas em camundongos CD1 nu/nu atímicos de 4-6 semanas de idade. Uma vez tendo os tumores alcançado tamanho de aproximadamente 150mm³, camundongos foram tratados duas vezes por semanas com 250 μ g de anticorpo em 0,2ml de PBS por injeção intraperitoneal. Tumores foram medidos por compasso de calibre Vernier através de dois diâmetros três vezes por semana e o volume foi calculado usando a fórmula (comprimento x [largura]²)/2. Dados foram analisados como segue: Log₁₀ de volumes de tumor transformados foram analisados usando uma análise de regressão de coeficiente aleatório. Isto estima a intercepção (linha base) e inclinação (taxa de crescimento de tumor) para cada grupo. Comparado com o grupo tratado com PBS, houve uma redução de 31% na taxa de crescimento no grupo de 6E11 (Figura 35, p=0,0007).

Em um experimento similar, camundongos nus foram implantados subcutaneamente com $2,5 \times 10^6$ células em Matrigel. Dezoito dias após a implantação, camundongos com volumes de tumor de 100-200 mm³ foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 8 animais/grupo de tratamento. Anticorpo 6E11 anti-IGF-1R foi administrado por injeção intraperitoneal em uma dose de 250µg/camundongo e 100µg/camundongo, duas vezes por semana por 3 semanas. Animais de controle receberam solução salina no mesmo horário. Tamanho de tumor e peso de corpo de camundongo foram medidos duas vezes por semana. Comparado com o grupo tratado com solução salina, houve uma redução de 56% e 70% no volume de tumor no dia 35 para os grupos de 100µg/camundongo e 250µg/camundongo respectivamente (Figura 36).

Em um estudo diferente, a atividade de vários anticorpos foi testada em comparação com o grupo de controle negativo de PBS. Camundongos atímicos CD1 nu/nu foram, cada um, implantados com $2,5 \times 10^6$ células LISN/3T3-c4 suspensas em Matrigel subcutaneamente e tamanho de tumor foi medido por calibre de compasso e o volume foi calculado pela seguinte equação: Volume de Tumor = comprimento x (largura)² x 0,5. Tendo os tumores alcançado um volume médio de ~150mm³, os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos com tamanhos de tumor comparáveis e cada animal recebeu 250µg de anticorpo monoclonal apropriado em PBS intraperitonealmente duas vezes por semana durante três semanas. Os grupos de tratamento foram 6E11 (mAb parental de camundongo), duas bateladas diferentes de H0L0 IgGm(AA) e H0L0. Tratamento apenas com PBS foi usado como um controle de veículo para estes estudos. Tamanho de grupo para este estudo foi um mínimo de quatorze animais. Dados são apresentados como o volume de tumor médio \pm erro padrão versus dias depois de tratamento com anticorpo. Ambos 6E11 e H0L0 mostraram reduções estatisticamente significativas na taxa de crescimento de tumor de 52%

($P < 0,0001$) e 60% ($P < 0,0001$) respectivamente (Figura 37). Consistente com um estudo inicial (dados não mostrados), nenhuma batelada de anticorpo H0L0 IgG1m(AA) significativamente alterou a taxa de crescimento de tumor comparado com o grupo de controle de PBS.

5 Em adição a uma redução em taxa de crescimento de tumor, houve uma melhoria em sobrevivência em tempo-para-separação de camundongos tratados como grupos 6E11 e H0L0 em comparação com o controle de PBS (dados não mostrados). Consistente com os dados de crescimento de tumor, o H0L0 IgGm(AA) não mostrou benefício em retardo
10 do tempo-para-separação (dados não mostrados).

Uma repetição deste estudo foi realizada usando anticorpos 6E11 e H0L0 exceto que Matrigel não foi usado. Os resultados deste estudo espelharam aqueles do estudo prévio, com 6E11 e H0L0 mostrando uma redução significativa em taxa de crescimento de tumor de 20% ($p = 0,0464$) e
15 29,7% ($p = 0,0037$) respectivamente comparado com o controle de PBS. Também houve uma melhoria em sobrevivência em tempo-para-separação de camundongos tratados com grupos 6E11 e H0L0 comparados com o controle de PBS. Um anticorpo irrelevante foi usado como um controle neste experimento e exibiu um perfil similar ao do grupo de PBS (dados não
20 mostrados).

Exemplo 28 - Inibição de crescimento de tumores de célula Colo205 por anticorpo parental de camundongo 6E11

Um modelo de tumor in vivo usando células Colo205 foi usado para estabelecer a capacidade do anticorpo monoclonal 6E11 para inibir
25 o crescimento de tumores pré-estabelecidos em camundongos nu/nu fêmeas HRLN. 1×10^6 Células Colo205 foram suspensas em Matrigel 50% e subcutaneamente implantadas no flanco dos camundongos nus. Tendo os tumores alcançado tamanho de aproximadamente $80\text{-}120\text{mm}^3$ (equivalente a dia 1 em Figura 38), os camundongos foram tratados cada 3 dias com

10mg/kg de anticorpo por injeção intraperitoneal, por um total de 10 injeções. Tumores foram medidos por compassos de calibre e o volume foi calculado usando a fórmula (comprimento x [largura]²)/2. Dados foram analisados como segue: Log₁₀ de volumes de tumor transformados foram analisados usando
5 uma análise de regressão de coeficiente aleatório. Este estima (linha base) e inclinação (taxa de crescimento de tumor) para cada grupo. Comparado como o controle de veículo (PBS), houve uma redução de 58% na taxa de crescimento no 6E11 (Figura 38, p=0,0019).

Um experimento similar àquele descrito acima foi realizado
10 em uma ocasião separada. Contudo, neste segundo experimento usando células Colo205 não foi observada inibição de crescimento de tumor para os animais tratados com 6E11. Os motivos para a ausência de inibição com 6E11 são desconhecidos (dados não mostrados).

Um experimento similar àquele descrito acima também foi
15 realizado usando camundongos implantados com 1×10^7 células A549. Contudo, neste experimento não foi observada inibição do crescimento de tumor para animais tratados com 6E11. Os motivos para a ausência de inibição com 6E11 são desconhecidos (dados não mostrados).

Embora os dados destes dois últimos experimentos pareçam
20 mostrar que os anticorpos da invenção não inibem crescimento de tumor nestes modelos, acredita-se que os primeiros dois modelos de tumor (o modelo de aloenxerto e o primeiro modelo de colo205) são mais robustos. Um anticorpo de controle que deu um sinal positivo (i.e. mostrou inibição de crescimento de tumor) nestes primeiros dois modelos não mostrou inibição no
25 segundo estudo de modelo de tumor Colo205 ou no estudo de modelo de tumor A549, conseqüentemente temos mais confiança de que os dados dos primeiros dois modelos de tumor são mais indicativos de atividade do anticorpo de teste do que aqueles dos segundos dois modelos.

Três estudos de xenoenxerto adicionais têm sido realizados

com 6E11 ou humanizado ou suas variantes. No primeiro estudo, a atividade de 6E11 foi comparada com H0L0 IgGm(AA) no modelo Colo205. Em contraste com os resultados apresentados em Figura 38, não houve evidência de inibição de crescimento de tumor após tratamento com 6E11 ou H0L0 IgGm(AA) comparado com o grupo de controle de PBS. Em um estudo repetido onde os grupos de tratamento foram PBS, 6E11, H0L0, um anticorpo de controle positivo e um anticorpo irrelevante de controle, nenhuns grupos mostraram qualquer evidência de inibição de crescimento de tumor com exceção do controle positivo que mostrou uma redução de 23% na taxa de crescimento de tumor em relação com PBS ($p=0,003$). Contudo, o anticorpo irrelevante de controle mostrou uma inibição de 15% de crescimento de tumor em comparação com PBS ($p=0,053$). Nenhuns anticorpos mostraram inibição de crescimento de tumor em relação ao anticorpo irrelevante de controle.

Em um modelo de xenoenxerto diferente (modelo de tumor de mama MCF-7), animais foram tratados como PBS, 6E11, H0L0, um anticorpo de controle positivo e um anticorpo irrelevante de controle. Neste estudo, nenhuns grupos de tratamento foram separados quer de PBS ou quer de anticorpo irrelevante de controle. Em ambos os estudos, tratamento com paclitaxel significativamente inibiu crescimento de tumor (dados não mostrados).

Em uma análise de pós-estudo, amostras de tumor colhidas no final de todos os três foram avaliadas para expressão de receptor por imunohistoquímica. Não foi observada evidência de expressão de receptor IGF-1R usando uma sonda de H0L0 biotinilada enquanto que o mesmo anticorpo marcado positivamente corou uma amostra de tumor LISN/3T3 c4 e amostras de tumor de paciente.

São desconhecidos os motivos para diferença evidente em atividade dos anticorpos entre o estudo Colo205 inicial apresentado em Figura 38, os resultados em-casa do modelo LISN (estudos IGF-1R-11 e IGF-1R-12)

e os resultados dos três estudos adicionais que não mostraram inibição mediada por anticorpo de crescimento de tumor. Contudo, o fato de que os tumores derivados de pelo menos algumas das células Colo205 e MCF-7 são negativos para receptor (incluindo o grupo de controle de PBS) no final do estudo acarreta preocupações sobre a validade destes experimentos particulares para avaliar a eficácia in vivo de anticorpos anti-IGF-1R.

Exemplo 29 - Cinética de reciclo de receptor

Para investigar o reaparecimento de receptor sob remoção de anticorpo, células NCI-H838 foram incubadas em meio de crescimento na presença de anticorpo H0L0 (H0L0) a 1,67µg/ml apresentado em Figura 39. A primeira amostra de células foi colhida a 0,5 hora após a adição de anticorpo. Todas as outras amostras foram lavadas inteiramente com PBS a 3 horas após a adição de anticorpo antes de retornarem para meio de crescimento. As células foram então colhidas at 3, 4, 5, 6, 7 e 24 horas após a adição de anticorpo e avaliadas para expressão de IGF-1R por *Western blot* usando um anticorpo de coelho anti-IGF-1RS c20 (Santa Cruz, sc713). Ligação foi detectada usando HRP anticorpo e IgG1 kappa foi usada como um anticorpo de controle negativo. Pistas 1 a 7 são colheitas a 0,5, 3, 4, 5, 6, 7, 24 horas. Pistas 8 & 9 são o controle de não-anticorpo e o anticorpo de controle (Sigma 15154) respectivamente e foram colhidas a 3 horas. Magic Mark (Sigma, LC5602) é mostrado em Pista 10. Após remoção de anticorpo (em t=3 horas), o *western blot* mostra que em t=7 horas (pista 6) não há evidência de expressão de IGF-1R. Em contraste aproximadamente em t=24 horas (pista 7, 21 horas após remoção de anticorpo), há uma banda forte consistente com a cadeia IGF-1R_β.

Um segundo experimento (dados não mostrados) confirmou que o reaparecimento de receptor foi mantido em 48, 72 e 96 horas. Estes dados sugerem que o reaparecimento da maioria do receptor ocorre dentro das primeiras 4-21 horas após a remoção do anticorpo.

Exemplo 30 - Ensaio de ligação de heterodímero IGF-1R/IR

Em células que expressam ambos receptores IGF-1R e de insulina (receptor de Insulina), tem sido mostrado que existe um receptor híbrido IGF-1R:Receptor de Insulina (InsR) (Pandini et al. (1999) Clin Cancer Res., 5(7): 1935-44). Tem sido recentemente mostrado que um anticorpo anti-IGF-1R que não reage cruzadamente contra o receptor de Insulina, reduziu os níveis de receptor de Insulina, mais provavelmente pela incorporação e pela degradação do receptor híbrido (Sachdev et al. (2006) Cancer Res., 66(4):2391-402).

Anticorpos humanizados foram avaliados para sua atividade contra o receptor híbrido usando ensaios de co-imunoprecipitação. No primeiro experimento mostrado em Figura 40A, células de carcinoma de cólon COLO-205 e células recombinantes NIH-3T3 expressando receptor de Insulina de humano foram lisadas sobre gelo por 10 minutos com tampão de lise NP40 1%, clareadas por centrifugação a 16400rpm por 20 minutos a 4°C. Proteínas celulares solúveis (500µg) foram imunoprecipitadas com 5 µg de anticorpo contra quer IGF-1R (6E11, quimera 6E11, H0L0 IgG1m(AA), IGF-1R beta, receptor (beta) de Insulina, ou IgG de humano não-selecionadora (controle). Proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à SDS PAGE redutora em geles de poliacrilamida 4-12%, transferidas para membranas de PVDF e imunomanchadas para quer IGF-1R ou receptor de Insulina. Anticorpos secundários fluorescentemente marcados foram usados e as imagens de imunomanchas de IGF-1R/Receptor obtidas usando um sistema LI COR Odyssey. Em um experimento diferente (Figura 40B) usando uma metodologia similar como descrita acima H0L0 e H0L0 IgG1m(AA) foram comparados. Notar que a fração não ligada refere-se ao material no sobrenadante após a imunoprecipitação. A subunidade β de 97kDa de IGF-1R e IGF-1R de comprimento total de 200kDa e a subunidade β de 95kDa de receptor de Insulina e receptor de Insulina de comprimento total de 200kDa

são mostrados em figuras. Como mostrado em Figuras 40A e 40B, os anticorpos humanizados foram capazes de co-imunoprecipitar o receptor de insulina e IGF-1R da linhagem celular de carcinoma de humano Colo205 em níveis comparáveis com a quimera 6E11. Os mesmos anticorpos não imunoprecipitaram o receptor de Insulina na ausência de IGF-1R (veja Figura 40A, quarto painel, pistas 1-5), indicando que os anticorpos não foram reativos contra o receptor de Insulina. Embora uma vasta maioria de IGF-1R fosse removida do lisado celular após imunoprecipitação com os anticorpos anti-IGF-1R indicando adicionalmente que os anticorpos humanizados podem ser ligar em ambos receptores IGF-1R:receptor de Insulina heterodimérico e IGF-1R homodimérico, (Figura 40B, painel superior, pistas 3-5), uma proporção boa de receptor de Insulina (mais provavelmente a porção homodimérica) permaneceu nos lisados de célula após IP (Figura 40B, painel inferior, pistas 3-5).

Exemplo 31 - Proliferação de celulase NCI-H929

A linhagem de célula de Mieloma de humano NCI-H929 foi estimulada com IGF-1 na presença de várias concentrações dos anticorpos selecionados em meio livre de soro. Células NCI-H929 foram lavadas em meio livre de soro e plaqueadas em uma placa de 96 cavidades a 4×10^4 células/cavidade. Diluições dos anticorpos selecionados foram adicionadas dentro da faixa de 20-0,019 $\mu\text{g/ml}$ por 1 h a 37°C antes da adição de uma concentração fixa de IGF-1 (25ng/ml). Células foram incubadas por 4 dias a 37°C antes que a proliferação fosse medida usando o kit de ensaio Promega Cell Titre Blue (Promega G8081). Figura 41 mostra a inibição dependente de dose da proliferação conduzida por IGF-1 de células NCI-H929 in vitro por H0L0 e 6E11 parental.

Exemplo 32 - Estabilidade em soro

Para investigar a estabilidade de H0L0 em soro de humano, uma alíquota de 500ml de anticorpo a 100 $\mu\text{g/ml}$ foi incubada por períodos de

até 12 dias em soro de humano 100% a -20°C, 4°C e 37°C. A atividade após 12 dias foi determinada por ELISA de ligação direta. Valores de EC-50 foram calculados e comparados com valores de EC-50 históricos de numerosos ELISAs prévios. Os resultados exibidos abaixo em Figura 42 confirmam que H0L0 não mostra queda em atividade quando incubado em soro por um período de até 12 dias a -20°C, 4°C ou 37°C.

Exemplo 33 - Farmacodinâmica de regulação negativa de receptor em modelo de xenoenxerto

Com o objetivo de confirmar que H0L0 pode infra-regular receptor IGF-1R in vivo, um ensaio in vivo baseado em linhagem de célula LISN/3T3 c4 está sendo correntemente desenvolvido baseado nas descobertas de outros (Cohen et al. (2005) Clin Cancer Res., 11(5):2063-73). No primeiro estudo, camundongos CD1 nu/nu atímicos foram implantados com $2,5 \times 10^6$ células 3T3/LISN em matrigel (Becton Dickinson). Quando os tumores alcançaram um tamanho de 400-500mm³, os camundongos foram dosados com 125 µg de quer anticorpo de controle quer H0L0. Camundongos foram separados em T= 16, 24, 48, 72 ou 120 horas após a dosagem. Tumores foram excisados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Amostras de tumor pesadas foram homogeneizadas em tampão RIPA mais inibidores de protease e fosfatase e um ensaio de proteína foi realizado no lisado após centrifugação. Um ensaio DELFIA (veja Exemplo 34) foi conduzido para avaliar os níveis relativos de IGF-1R total nas amostras de tumor. Como mostrado em Figura 43A, tratamento com H0L0 parece ter algum impacto sobre o receptor total no período de tempo de 24-72 horas embora a magnitude do efeito seja substancialmente menor do que tem sido previamente relatada (Cohen, 2005).

Em um segundo estudo, grupos de camundongos (n=6) foram implantados como acima. Quando os tumores alcançaram um tamanho de 400-500mm³ os camundongos foram dosados duas vezes 72 horas

separadamente com 250µg de quer anticorpo de controle quer H0L0 24 horas após a dose final, 10µg de IGF-1 recombinante de humano foi administrado intravenosamente. Após 10 min, os tumores foram excisados e congelados em nitrogênio líquido. Ensaio DELFIA de IGF-1R total foi realizado como descrito em Exemplo 34. Embora os animais fossem tratados com IGF-I, 5 nenhuma mudanças consistentes nos níveis de receptor fosforilado foram observadas em comparação com o grupo de controle não tratado. Contudo, os grupos tratados com os anticorpos anti-IGF-1R (6E11, H0L0) mostraram uma redução nos níveis totais de receptor (Figura 43B). Um efeito similar foi visto 10 nas amostras de tumor terminal do estudo de eficácia (dados não mostrados). Um estudo combinado que investigou os efeitos sobre fosforilação de receptor e níveis totais de receptor no decorrer do tempo mostrou-se não conclusivo (dados não mostrados).

Exemplo 34 - Ensaio DELFIA de IGF-1R total

15 100 µl de lisado de tumores contendo 10 ou 25µg de proteína foram carregados em placas de ELISA previamente revestidas com um anticorpo de captura 2B9 anti-IGF-1R (veja exemplo 13). As placas foram incubadas durante a noite a 4°C e então lavadas em TBST. 100µl de anticorpo policlonal biotinilado anti-IGF-1R (R&D Systems BAF391) a 400ng/ml em 20 4%BSA/TBS foram adicionados em cada cavidade e incubados por 1 hora na temperatura ambiente. Placas foram lavadas em TBST e 100µl de Estreptavidina marcada com Eu (Perkin Elmer 1244-360) em diluição de 1/1000 foram adicionados em cada cavidade e incubados por 1 hora na temperatura ambiente. Placas foram lavadas em TBST e 100µl de solução 25 DELFIA Enhancement (Perkin Elmer 1244-105) foram adicionados em cada cavidade e incubados por 10min. Um sinal de fluorescência resolvida por tempo foi medido usando uma leitora de placa Wallac Victor multilabel.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> HAMBLIN, Paul Andrew
 ELLIS, Jonathan Henry
 SHAH, Radha
 BURDEN, Neil
 LEWIS, Alan

<120> Novos Anticorpos

<130> PB62325

<150> GB0702888.9

<151> 2007-02-14

<150> us60/953210

<151> 2007-08-01

<160> 70

<170> FastSEQ para Versão Windows 4.0

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 1

Trp	Ile	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10				

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 2

Asn	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5				10						15	

Asp

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 3

Asp	Tyr	Tyr	Met	Asn
1				5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 4

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	Gln	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	Tyr	Leu	Glu
1				5					10					15	

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 5
 Arg Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 6
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 7
 Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 8
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Ser Lys Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 9
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

<210> 10
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

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

<210> 11
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 11
 Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ser Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Asp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 100 105

<210> 12

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia Pesada Variável Quimérica compreendendo seqüências
 de mus musculus e homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia Pesada Variável Quimérica compreendendo seqüências
 de mus musculus e homo sapiens

<400> 13

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

<210> 14
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

<210> 15
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 15
 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 Ala Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp 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 Trp Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Ser Lys Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 16
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Gln Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de Etiqueta Biotinilada

<400> 17
 Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

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

<210> 19
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 19
 Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp His Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Gln Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala

<210> 20

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

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

<210> 21
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 21
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala

<210> 22
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Ala Asn Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Thr Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Trp Ile Leu Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 23
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala

<210> 24
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Cadeia Pesada Variável Quimérica compreendendo seqüências
 de mus musculus e homo sapiens

<400> 24
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Phe Phe Leu Leu Ser Glu Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Ser Lys Trp Tyr
 115 120 125
 Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

165 170 175
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 210 215 220
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 260 265 270
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 340 345 350
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 370 375 380
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 25

<211> 238

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia Pesada Variável Quimérica compreendendo seqüências de mus musculus e homo sapiens

<400> 25

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

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

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

<210> 26
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Mus Musculus

<400> 26
 gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaggata 60
 tcctgtaagg cttctggata cgcgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg ggtggcaaat attaattcca acaatgggtg tactaactac 180
 aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca agtcctccaa cacagcctac 240
 atggagctcc gcagtctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggatt 300
 ctttactacg gtcgtagcaa atggtacttc gatgtctggg gcacagggac cacggtcacc 360
 gtctcctcg 369

<210> 27
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Mus Musculus

<400> 27
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcacgcctcc 60
 atctcttgca gatctagta gagtattgtt caaagtaatg gagacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagaatttc caaccgattt 180
 tctggggctc cagacagggt cagtggcagt ggatcagggc cagatttcac actcaagatc 240
 agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaggggtc acatgttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacggg ct 342

<210> 28
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Mus Musculus

<400> 28
 gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaggata 60
 tcctgtaagg cttctggata cgcgttcact gactactaca tgaactgggt gaaacagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg gatggcaaat attaattcca acaatgggtg tactaactac 180
 aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca agtcctccaa cacagcctac 240
 atggagctcc gcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatggatt 300
 ctttactacg gtcgtagcaa gtggtacttc gatgtctggg gccacagggac cacggtcacc 360
 gtctcctcg 369

<210> 29

<211> 342
 <212> DNA
 <213> Mus Musculus

<400> 29
 gatgttttga tgacccaaag tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcacgcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgtt caaagtaatg gagacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct atagagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcagggttc acatgttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacggg ct 342

<210> 30
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Cadeia Pesada Variável Quimérica compreendendo seqüências
 de mus musculus e homo sapiens

<400> 30
 gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgag ctgggtgaagc ctgggggttc agtgaggata 60
 tcctgtaagg cttctggata cgcgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg ggtggcaaatt attaatccca acaatgggtg tactaactac 180
 aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca agtctctcaa cacagcctac 240
 atggagctcc gcagtctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggatt 300
 ctttactacg gtcgtagcaa atggtacttc gatgtctggg gcacaggggac actagtcaca 360
 gtctcctca 369

<210> 31
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Cadeia Pesada Variável Quimérica compreendendo seqüências
 de mus musculus e homo sapiens

<400> 31
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcacgcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagtattgtt caaagtaatg gagacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagaatttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcagggttc acatgttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cg 342

<210> 32
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Cadeia Pesada Variável Quimérica compreendendo seqüências
 de mus musculus e homo sapiens

<400> 32
 atgggatgga gctggatctt tttcttctc ctgtcagaaa ctgcagggtg cctctctgag 60
 gtccagctgc aacaatctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaggatatcc 120
 tgtaaggctt ctggatacgc gttcactgac tactacatga actgggtgaa gcagagccat 180
 ggaaagagcc ttgagtgggt ggcaaatatt aatcccaaca atggtggtac taactacaac 240
 cagaagttca aggacaaggc cacattgact gtagacaagt cctccaacac agcctacatg 300

```

gagctccgca gtctgacatc tgaggacact gcagtctatt actgtgcaag atggattctt 360
tactacggtc gtagcaaatg gtacttcgat gtctggggca cagggacact agtcacagtc 420
tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggccct gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 780
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acacctcat gatctcccgg 840
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 960
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1080
atctccaaag ccaaggggca gccccgagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg 1140
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttcc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaata 1419

```

<210> 33

<211> 717

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia Pesada Variável Quimérica compreendendo seqüências de mus musculus e homo sapiens

<400> 33

```

atgaagttgc ctgttcggct cgtgggtgctg atgtttctgga ttctgtcttc cagcagtgat 60
gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca cgctccatc 120
tcttgcatat ctatgcagag tattgttcaa agtaatggag acacctatctt agaattggtac 180
ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca gaatttccaa ccgattttct 240
ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggagacag atttcacact caagatcagt 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat tactgttttc aggggttcaca tgttccgtac 360
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa totggaaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggacaacgc cctccaatcg 540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acagggggaga gtgttag 717

```

<210> 34

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

```

caggtccagc tgggtgcagag cggcgagag gtgaagaagc ccggagctag cgtcaaggtc 60
tcctgcaagg cttcaggcta cacattcacc gactactaca tgaactgggt gagacaggct 120
ccaggacagg gcctcgagtg gatgggcaac atcaacccca acaatggcgg gacaaactac 180
aaccagaagt tcaaggatcg cgtgaccatg accaccgaca ctagcacctc aacagcctac 240
atggagctga ggtctctgcg gagcagtgac actgccgtgt actactgtgc caggtggatt 300
ctgtactacg ggaggagcaa gtggtacttc gacgtctggg gaagaggagc actagtgacc 360
gtgagcagc

```

369

<210> 35

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

caggtccagc	tgggtgcagag	cggcgcgagag	gtgaagaagc	cgggagctag	cgtcaaggct	60
tctctgcaagg	cttcagggcta	cgccttcacc	gactactaca	tgaactgggt	gagacagggt	120
ccaggacagg	gcctcgagtg	gatgggcaac	atcaacccca	acaatggcgg	gacaaactac	180
aaccagaagt	tcaaggatcg	cgtgaccatg	accaccgcga	ctagcacctc	aacagcctac	240
atggagctga	ggtctctgcy	gagcgatgac	actgcctgtg	actactgtgc	caggtggatt	300
ctgtactacg	ggaggagcaa	gtgggtacttc	gacgtctggg	gaagagggac	actagtgacc	360
gtgagcagc						369

```
<210> 36
<211> 342
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400>	36						
gacatcgtca	tgaccagag	cccactgtca	ctccccgtga	caccggaga	gcccgctagc	60	
atcacgtcta	gaagctccca	gagcatcgtg	cagtctaacy	gcgatacctt	cctcgagtgg	120	
tacctgcaga	agcccgaca	gtctctcaga	ctcctgattt	accgctcag	caatcgcttt	180	
tccggggtgc	ctgactcggt	tagcggctca	ggaagcggaa	ccgacttcac	cctgaagatc	240	
tcaagggtgg	aggctgagga	tgtgggcgtg	tactactgct	tccagggatc	tcacgtgcct	300	
tacaccttcg	gacagggcac	aaagctcgag	attaagcgta	cg		342	

```
<210> 37
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400>	37															
Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	
1				5					10					15		
Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	
			20					25					30			
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
		35					40					45				
Thr	Asp	Tyr	Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
	50					55					60					
Glu	Trp	Met	Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	
65				70						75					80	
Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	
				85					90					95		
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	
			100					105					110			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Ile	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	
		115					120					125				
Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	
	130					135					140					
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	
145				150						155					160	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	
				165					170					175		
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	
			180					185					190			
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	
		195					200					205				
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	
	210					215					220					
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	
225					230					235					240	
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
				245					250					255		
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
			260					265					270			
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
		275					280						285			

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 340 345 350
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 370 375 380
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 38
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Ser Lys Trp Tyr
 115 120 125
 Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 210 215 220
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

245 250 255
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 260 265 270
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 340 345 350
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 370 375 380
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415
 Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 39
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val Gln Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

210
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 40
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 atgggatggt cctgtatcat cctgtttctg gtggccacag caactggcgt gcaactctcag 60
 gtccagctgg tgcagagcgg cgcagaggtg aagaagcccg gagctagcgt caaggtctcc 120
 tgcaaggctt caggctacac attcaccgac tactacatga actgggtgag acaggtcca 180
 ggacagggcc tcgagtggat gggcaacatc aaccccaaca atggcgggac aaactacaac 240
 cagaagttca aggatcgcggt gaccatgacc accgacacta gcacctcaac agcctacatg 300
 gagctgaggt ctctgcgagg cgatgacact gccgtgtact actgtgccag gtggattctg 360
 tactacggga ggagcaagtg gtacttcgac gtctggggaa gagggacact agtgaccgtg 420
 tccagcgcca gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 480
 agcggcgcca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga accggtgacc 540
 gtgtcctgga acagcggagc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 600
 agcagcgccc tgtacagcct gagcagcgtg gtgaccgtgc ccagcagcag cctgggcacc 660
 cagacctaca tctgtaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaagggtg 720
 gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgccccccct gccctgcccc cgagctgctg 780
 ggaggcccca gcgtgttctt gttccccccc aagcctaagg acaccctgat gatcagcaga 840
 acccccagag tgacctgtgt ggtggtggat gtgagccacg aggaccctga ggtgaagtgc 900
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaaga ccaagcccag ggaggagcag 960
 tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac 1020
 ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgccccctat cgagaaaacc 1080
 atcagcaagg ccaagggcca gccagagag cccaggtgt acaccctgcc ccctagcaga 1140
 gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tgaagggtt ctaccccagc 1200
 gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagccccgaga acaactacaa gaccaccccc 1260
 cctgtgctgg acagcgatgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1320
 agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac 1380
 tacaccacga agagcctgag cctgtccccct ggcaagtga 1419

<210> 41
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 atgggatggt cctgtatcat cctgtttctg gtggccacag caactggcgt gcaactctcag 60
 gtccagctgg tgcagagcgg cgcagaggtg aagaagcccg gagctagcgt caaggtctcc 120
 tgcaaggctt caggctacgc cttcaccgac tactacatga actgggtgag acaggtcca 180
 ggacagggcc tcgagtggat gggcaacatc aaccccaaca atggcgggac aaactacaac 240
 cagaagttca aggatcgcggt gaccatgacc accgacacta gcacctcaac agcctacatg 300
 gagctgaggt ctctgcgagg cgatgacact gccgtgtact actgtgccag gtggattctg 360
 tactacggga ggagcaagtg gtacttcgac gtctggggaa gagggacact agtgaccgtg 420
 tccagcgcca gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 480
 agcggcgcca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga accggtgacc 540
 gtgtcctgga acagcggagc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 600
 agcagcgccc tgtacagcct gagcagcgtg gtgaccgtgc ccagcagcag cctgggcacc 660
 cagacctaca tctgtaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaagggtg 720
 gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgccccccct gccctgcccc cgagctgctg 780
 ggaggcccca gcgtgttctt gttccccccc aagcctaagg acaccctgat gatcagcaga 840
 acccccagag tgacctgtgt ggtggtggat gtgagccacg aggaccctga ggtgaagtgc 900
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaaga ccaagcccag ggaggagcag 960
 tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac 1020
 ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgccccctat cgagaaaacc 1080
 atcagcaagg ccaagggcca gccagagag cccaggtgt acaccctgcc ccctagcaga 1140
 gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tgaagggtt ctaccccagc 1200
 gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagccccgaga acaactacaa gaccaccccc 1260

cctgtgctgg acagcgatgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1320
 agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac 1380
 tacaccaga agagcctgag cctgtccctt ggcaagtga 1419

<210> 42

<211> 717

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

atgggatggt cctgcatcat cctgttctctg gtggcaactg ccactggagt ccactccgac 60
 atcgtcatga cccagagccc actgtcactc cccgtgacac ccggagagcc cgctagcatc 120
 agctgtagaa gctcccagag catcgtgcag tctaacggcg atacctacct cgagtggtag 180
 ctgcagaagc ccggacagtc tcctcagctc ctgatttacc gcgtcagcaa tcgcttttcc 240
 ggggtgcctg atcggtttag cggctcagga agcggaaaccg acttcaccct gaagatctca 300
 aggggtggagg ctgaggatgt gggcgtgtac tactgcttcc agggatctca cgtgccttac 360
 accttcggac agggcacaaa gctcgagatt aagcgtacgg tggccgcccc cagcgtgttc 420
 atcttcccc ccagcgatga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 480
 aacaacttct acccccggga ggccaagggt cagtggaagg tggacaatgc cctgcagagc 540
 ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 600
 agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 660
 acccaccagg gcctgtccag ccccgtagacc aagagcttca accggggcga gtgctga 717

<210> 43

<211> 19

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência líder Campath

<400> 43

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

<210> 44

<211> 1367

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

145		150		155		160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys						
	165		170		175	
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys						
	180		185		190	
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr						
	195		200		205	
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys						
	210		215		220	
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser						
	225		230		235	
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr						
	245		250		255	
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu						
	260		265		270	
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala						
	275		280		285	
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met						
	290		295		300	
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr						
	305		310		315	
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys						
	325		330		335	
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly						
	340		345		350	
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn						
	355		360		365	
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val						
	370		375		380	
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser						
	385		390		395	
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly						
	405		410		415	
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp						
	420		425		430	
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe						
	435		440		445	
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu						
	450		455		460	
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg						
	465		470		475	
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr						
	485		490		495	
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr						
	500		505		510	
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys						
	515		520		525	
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys						
	530		535		540	
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys						
	545		550		555	
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln						
	565		570		575	
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp						
	580		585		590	
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala						
	595		600		605	
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser						
	610		615		620	
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn						
	625		630		635	
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr						
	645		650		655	

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
 660 665 670
 Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
 675 680 685
 Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
 690 695 700
 Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
 705 710 715 720
 Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
 725 730 735
 Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
 740 745 750
 Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
 755 760 765
 Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
 770 775 780
 Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
 785 790 795 800
 Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
 805 810 815
 Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
 820 825 830
 Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
 835 840 845
 Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
 850 855 860
 Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
 865 870 875 880
 Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
 885 890 895
 Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
 900 905 910
 Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
 915 920 925
 Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
 930 935 940
 Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
 945 950 955 960
 Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
 965 970 975
 Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
 980 985 990
 Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
 995 1000 1005
 Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys Asp
 1010 1015 1020
 Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala Ala Ser
 1025 1030 1035 1040
 Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Glu
 1045 1050 1055
 Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val Val Ser Gln Gly
 1060 1065 1070
 Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr Arg Gly Asp Leu Lys
 1075 1080 1085
 Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met Glu Asn Asn Pro Val Leu
 1090 1095 1100
 Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala
 1105 1110 1115 1120
 Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu
 1125 1130 1135
 Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly
 1140 1145 1150
 Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys

1155					1160					1165					
Gly	Gly	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Arg	Trp	Met	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu
1170					1175					1180					
Lys	Asp	Gly	Val	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val
1185					1190					1195					
Val	Leu	Trp	Glu	Ile	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Gln	Pro	Tyr	Gln	Gly	Leu
1205					1210					1215					
Ser	Asn	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Met	Glu	Gly	Gly	Leu	Leu	Asp
1220					1225					1230					
Lys	Pro	Asp	Asn	Cys	Pro	Asp	Met	Leu	Phe	Glu	Leu	Met	Arg	Met	Cys
1235					1240					1245					
Trp	Gln	Tyr	Asn	Pro	Lys	Met	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Glu	Ile	Ile	Ser
1250					1255					1260					
Ser	Ile	Lys	Glu	Glu	Met	Glu	Pro	Gly	Phe	Arg	Glu	Val	Ser	Phe	Tyr
1265					1270					1275					
Tyr	Ser	Glu	Glu	Asn	Lys	Leu	Pro	Glu	Pro	Glu	Glu	Leu	Asp	Leu	Glu
1285					1290					1295					
Pro	Glu	Asn	Met	Glu	Ser	Val	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser
1300					1305					1310					
Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Asp	Arg	His	Ser	Gly	His	Lys	Ala	Glu	Asn	Gly
1315					1320					1325					
Pro	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Arg	Ala	Ser	Phe	Asp	Glu	Arg	Gln
1330					1335					1340					
Pro	Tyr	Ala	His	Met	Asn	Gly	Gly	Arg	Lys	Asn	Glu	Arg	Ala	Leu	Pro
1345					1350					1355					
Leu	Pro	Gln	Ser	Ser	Thr	Cys									
1365															

<210> 45

<211> 1367

<212> PRT

<213> macaco cinomolgo

<400> 45

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

225	230	235	240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr			
	245	250	255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu			
	260	265	270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala			
	275	280	285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met			
	290	295	300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr			
305	310	315	320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys			
	325	330	335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly			
	340	345	350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn			
	355	360	365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val			
	370	375	380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser			
385	390	395	400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly			
	405	410	415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp			
	420	425	430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe			
	435	440	445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu			
	450	455	460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg			
465	470	475	480
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr			
	485	490	495
Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr			
	500	505	510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys			
	515	520	525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys			
	530	535	540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys			
545	550	555	560
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln			
	565	570	575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp			
	580	585	590
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala			
	595	600	605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser			
	610	615	620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn			
625	630	635	640
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr			
	645	650	655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys			
	660	665	670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys			
	675	680	685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys			
	690	695	700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys			
705	710	715	720
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu			
	725	730	735

Arg	Lys	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser	Ser	
			740					745					750			
Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp	Leu	
		755					760					765				
Glu	Glu	Leu	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Asn	
	770					775					780					
Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg	
785					790					795					800	
Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	Ser	
				805					810						815	
Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala	Asp	
			820					825					830			
Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu	Asn	Ser	Ile	
		835					840					845				
Phe	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Leu	Ile	Leu	Met	
	850					855					860					
Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Cys	Val	
865					870					875					880	
Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	
				885					890						895	
Asn	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly	
		900						905					910			
Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro	Val	Phe	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Lys	Thr	
	915						920					925				
Gly	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ile	His	Leu	Ile	Ile	Ala	Leu	Pro	Val	Ala	Val	
	930					935					940					
Leu	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Met	Leu	Tyr	Val	Phe	His	Arg	
945					950					955					960	
Lys	Arg	Asn	Asn	Ser	Arg	Leu	Gly	Asn	Gly	Val	Leu	Tyr	Ala	Ser	Val	
				965					970						975	
Asn	Pro	Glu	Tyr	Phe	Ser	Ala	Ala	Asp	Val	Tyr	Val	Pro	Asp	Glu	Trp	
		980						985					990			
Glu	Val	Ala	Arg	Glu	Lys	Ile	Thr	Met	Ser	Arg	Glu	Leu	Gly	Gln	Gly	
	995						1000					1005				
Ser	Phe	Gly	Met	Val	Tyr	Glu	Gly	Val	Ala	Lys	Gly	Val	Val	Lys	Asp	
	1010					1015					1020					
Glu	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Val	Asn	Glu	Ala	Ala	Ser	
1025					1030					1035					1040	
Met	Arg	Glu	Arg	Ile	Glu	Phe	Leu	Asn	Glu	Ala	Ser	Val	Met	Lys	Glu	
				1045					1050						1055	
Phe	Asn	Cys	His	His	Val	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	Val	Val	Ser	Gln	Gly	
			1060					1065					1070			
Gln	Pro	Thr	Leu	Val	Ile	Met	Glu	Leu	Met	Thr	Arg	Gly	Asp	Leu	Lys	
	1075						1080					1085				
Ser	Tyr	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Met	Glu	Asn	Asn	Pro	Val	Leu	
	1090					1095					1100					
Ala	Pro	Pro	Ser	Leu	Ser	Lys	Met	Ile	Gln	Met	Ala	Gly	Glu	Ile	Ala	
1105					1110					1115					1120	
Asp	Gly	Met	Ala	Tyr	Leu	Asn	Ala	Asn	Lys	Phe	Val	His	Arg	Asp	Leu	
			1125						1130					1135		
Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Val	Ala	Glu	Asp	Phe	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	
		1140						1145					1150			
Asp	Phe	Gly	Met	Thr	Arg	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Lys	
	1155					1160					1165					
Gly	Gly	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Arg	Trp	Met	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	
	1170					1175					1180					
Lys	Asp	Gly	Val	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	
1185					1190					1195					1200	
Val	Leu	Trp	Glu	Ile	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Gln	Pro	Tyr	Gln	Gly	Leu	
			1205						1210						1215	
Ser	Asn	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Met	Glu	Gly	Gly	Leu	Leu	Asp	
		1220						1225					1230			
Lys	Pro	Asp	Asn	Cys	Pro	Asp	Met	Leu	Phe	Glu	Leu	Met	Arg	Met	Cys	


```

      1235      1240      1245
Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile Ser
  1250      1255      1260
Ser Ile Lys Asp Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser Phe Tyr
1265      1270      1275      1280
Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu Asp Leu Glu
      1285      1290      1295
Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser Ala Ser Ser Ser
      1300      1305      1310
Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His Lys Ala Glu Asn Gly
      1315      1320      1325
Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala Ser Phe Asp Glu Arg Gln
      1330      1335      1340
Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro
1345      1350      1355      1360
Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
      1365

```

```

<210> 46
<211> 1373
<212> PRT
<213> Mus Musculus

```

```

<400> 46
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
  1      5      10      15
Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
      20      25      30
Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
      35      40      45
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile
      50      55      60
Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65      70      75      80
Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
      85      90      95
Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
      100      105      110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
      115      120      125
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
      130      135      140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile
145      150      155      160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
      165      170      175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys
      180      185      190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
      195      200      205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
      210      215      220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225      230      235      240
Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
      245      250      255
Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
      260      265      270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
      275      280      285
Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met
      290      295      300

```

Gln	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Ser	Thr	Gln	Ser	Met	Tyr
305					310					315					320
Cys	Ile	Pro	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Val	Cys	Gly	Asp	Glu	Glu
			325						330					335	
Lys	Lys	Thr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Met	Leu	Gln
			340					345					350		
Gly	Cys	Thr	Ile	Leu	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly
		355					360					365			
Asn	Asn	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Phe	Met	Gly	Leu	Ile	Glu	Val
	370					375					380				
Val	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	His	Ser	His	Ala	Leu	Val	Ser	Leu
385					390					395					400
Ser	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu
			405						410					415	
Gly	Asn	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu
		420						425					430		
Trp	Asp	Trp	Asn	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Val	Arg	Ser	Gly	Lys	Met	Tyr
		435					440					445			
Phe	Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu
	450					455					460				
Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr
465					470					475					480
Arg	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Phe
			485						490					495	
Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Trp	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg
			500					505					510		
Tyr	Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr
	515						520					525			
Lys	Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala
	530					535					540				
Cys	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn
545					550					555					560
Lys	Glu	Gly	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr
			565						570					575	
Gln	Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn
			580					585					590		
Asp	His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn
	595						600					605			
Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser
	610					615					620				
Ser	Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly
625					630					635					640
Asn	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Val	Arg	Trp	Gln	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly
			645						650					655	
Tyr	Leu	Tyr	Arg	His	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg
		660						665					670		
Lys	Tyr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Val	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Asn	Pro
		675					680					685			
Lys	Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Asp	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro
	690					695					700				
Lys	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg
705					710					715					720
Lys	Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro
			725						730					735	
Glu	Arg	Arg	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser
			740					745					750		
Ser	Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Val	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp
		755					760					765			
Pro	Glu	Glu	Phe	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp
	770					775					780				
Asn	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr
785					790					795					800
Arg	Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys

[illegible]

Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Leu Pro Glu Arg His Ser Gly
 1315 1320 1325
 His Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala
 1330 1335 1340
 Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg Ala
 1345 1350 1355 1360
 Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
 1365 1370

<210> 47
 <211> 1180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
 20 25 30
 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
 35 40 45
 Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
 50 55 60
 Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
 65 70 75 80
 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
 85 90 95
 Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
 100 105 110
 Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
 115 120 125
 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
 130 135 140
 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
 165 170 175
 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
 180 185 190
 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
 195 200 205
 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
 210 215 220
 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
 225 230 235 240
 Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
 245 250 255
 Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
 260 265 270
 Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
 275 280 285
 Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
 290 295 300
 Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
 305 310 315 320
 Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
 325 330 335
 Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
 340 345 350
 Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
 355 360 365
 Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val

370	375	380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser		
385	390	395
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly		400
	405	410
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp		415
	420	425
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe		430
	435	440
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu		445
	450	455
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg		460
465	470	475
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr		480
	485	490
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr		495
	500	505
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys		510
	515	520
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys		525
	530	535
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys		540
545	550	555
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln		560
	565	570
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp		575
	580	585
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala		590
	595	600
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser		605
	610	615
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn		620
625	630	635
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr		640
	645	650
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys		655
	660	665
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys		670
	675	680
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys		685
	690	695
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys		700
705	710	715
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu		720
	725	730
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser		735
	740	745
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro		750
	755	760
Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn		765
	770	775
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg		780
785	790	795
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser		800
	805	810
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp		815
	820	825
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile		830
	835	840
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met		845
	850	855
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val		860
865	870	875
		880

Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu
				885					890					895	
Asn	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly
			900					905					910		
Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro	Val	Phe	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Lys	Thr
			915				920					925			
Gly	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ile	His	Ala	Ala	Ala	Ile	Glu	Gly	Arg	Ser	Gly
	930					935					940				
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
945					950					955					960
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				965					970					975	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
			980					985					990		
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
		995					1000					1005			
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
	1010					1015					1020				
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
1025					1030					1035					1040
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
				1045					1050					1055	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
			1060					1065					1070		
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
		1075					1080					1085			
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
	1090					1095					1100				
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
1105					1110					1115					1120
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				1125					1130					1135	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
			1140						1145				1150		
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
		1155					1160					1165			
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Leu	Arg	Arg	Ala	Ser	Leu	Gly				
	1170					1175					1180				

```
<210> 48
<211> 1180
<212> PRT
<213> macaco cinomolgo
```

<400> 48															
Met	Lys	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Leu
1				5				10						15	
Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Trp	Pro	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile
			20					25					30		
Cys	Gly	Pro	Gly	Ile	Asp	Ile	Arg	Asn	Asp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Lys	Arg
		35					40					45			
Leu	Glu	Asn	Cys	Thr	Val	Ile	Glu	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Leu	Leu	Ile
	50					55					60				
Ser	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Arg	Phe	Pro	Lys	Leu	Thr	Val
65				70						75				80	
Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu
				85					90					95	
Gly	Asp	Leu	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys	Leu	Phe
			100					105					110		
Tyr	Asn	Tyr	Ala	Leu	Val	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Asn	Leu	Lys	Asp	Ile
		115					120					125			
Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala	Ile	Arg	Ile	Glu

130	135	140
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile		
145	150	155
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys		
	165	170
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys		
	180	185
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr		
	195	200
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Ala Cys Gly Lys Arg Ala Cys		
	210	215
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser		
225	230	235
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr		
	245	250
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu		
	260	265
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala		
	275	280
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met		
	290	295
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr		
305	310	315
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys		
	325	330
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly		
	340	345
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn		
	355	360
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val		
	370	375
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser		
385	390	395
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly		
	405	410
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp		
	420	425
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe		
	435	440
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu		
	450	455
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg		
465	470	475
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr		
	485	490
Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr		
	500	505
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys		
	515	520
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys		
	530	535
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys		
545	550	555
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln		
	565	570
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp		
	580	585
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala		
	595	600
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser		
	610	615
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn		
625	630	635
		640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
 645 650 655
 Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
 660 665 670
 Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
 675 680 685
 Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
 690 695 700
 Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
 705 710 715 720
 Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
 725 730 735
 Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
 740 745 750
 Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Leu
 755 760 765
 Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
 770 775 780
 Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
 785 790 795 800
 Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
 805 810 815
 Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
 820 825 830
 Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
 835 840 845
 Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
 850 855 860
 Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
 865 870 875 880
 Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
 885 890 895
 Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
 900 905 910
 Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
 915 920 925
 Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Ala Ala Ala Ile Glu Gly Arg Ser Gly
 930 935 940
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 945 950 955 960
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 965 970 975
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 980 985 990
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 995 1000 1005
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 1010 1015 1020
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 1025 1030 1035 1040
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 1045 1050 1055
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 1060 1065 1070
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 1075 1080 1085
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 1090 1095 1100
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 1105 1110 1115 1120
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 1125 1130 1135
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser


```

      1140              1145              1150
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
      1155              1160              1165
Leu Ser Pro Gly Lys Leu Arg Arg Ala Ser Leu Gly
      1170              1175              1180

```

```

<210> 49
<211> 71
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 49
Met Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln
 1              5              10              15
Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr
      20              25              30
Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys
      35              40              45
Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro
 50              55              60
Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65              70

```

```

<210> 50
<211> 86
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

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

```

```

<210> 51
<211> 68
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 51
Met Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp
 1              5              10              15
Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro
      20              25              30
Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys
      35              40              45
Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro
 50              55              60
Ala Lys Ser Glu
65

```

<210> 52
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Met Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp
 1 5 10 15
 Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro
 20 25 30
 Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys
 35 40 45
 Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro
 50 55 60
 Ala Lys Ser Glu Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
 65 70 75 80
 Trp His Glu

<210> 53
 <211> 1382
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Met Gly Thr Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Ala Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ala Ala Gly His Leu Tyr Pro Gly
 20 25 30
 Glu Val Cys Pro Gly Met Asp Ile Arg Asn Asn Leu Thr Arg Leu His
 35 40 45
 Glu Leu Glu Asn Cys Ser Val Ile Glu Gly His Leu Gln Ile Leu Leu
 50 55 60
 Met Phe Lys Thr Arg Pro Glu Asp Phe Arg Asp Leu Ser Phe Pro Lys
 65 70 75 80
 Leu Ile Met Ile Thr Asp Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Tyr Gly Leu
 85 90 95
 Glu Ser Leu Lys Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Ser
 100 105 110
 Arg Leu Phe Phe Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Val His Leu
 115 120 125
 Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Asn Leu Met Asn Ile Thr Arg Gly Ser Val
 130 135 140
 Arg Ile Glu Lys Asn Asn Glu Leu Cys Tyr Leu Ala Thr Ile Asp Trp
 145 150 155 160
 Ser Arg Ile Leu Asp Ser Val Glu Asp Asn Tyr Ile Val Leu Asn Lys
 165 170 175
 Asp Asp Asn Glu Glu Cys Gly Asp Ile Cys Pro Gly Thr Ala Lys Gly
 180 185 190
 Lys Thr Asn Cys Pro Ala Thr Val Ile Asn Gly Gln Phe Val Glu Arg
 195 200 205
 Cys Trp Thr His Ser His Cys Gln Lys Val Cys Pro Thr Ile Cys Lys
 210 215 220
 Ser His Gly Cys Thr Ala Glu Gly Leu Cys Cys His Ser Glu Cys Leu
 225 230 235 240
 Gly Asn Cys Ser Gln Pro Asp Asp Pro Thr Lys Cys Val Ala Cys Arg
 245 250 255
 Asn Phe Tyr Leu Asp Gly Arg Cys Val Glu Thr Cys Pro Pro Pro Tyr
 260 265 270
 Tyr His Phe Gln Asp Trp Arg Cys Val Asn Phe Ser Phe Cys Gln Asp
 275 280 285
 Leu His His Lys Cys Lys Asn Ser Arg Arg Gln Gly Cys His Gln Tyr

290	295	300
Val Ile His Asn Asn Lys Cys Ile Pro Glu Cys Pro Ser Gly Tyr Thr		
305	310	315
Met Asn Ser Ser Asn Leu Leu Cys Thr Pro Cys Leu Gly Pro Cys Pro		
	325	330
Lys Val Cys His Leu Leu Glu Gly Glu Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr		
	340	345
Ser Ala Gln Glu Leu Arg Gly Cys Thr Val Ile Asn Gly Ser Leu Ile		
	355	360
Ile Asn Ile Arg Gly Gly Asn Asn Leu Ala Ala Glu Leu Glu Ala Asn		
	370	375
Leu Gly Leu Ile Glu Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Lys Ile Arg Arg Ser		
385	390	395
Tyr Ala Leu Val Ser Leu Ser Phe Phe Arg Lys Leu Arg Leu Ile Arg		
	405	410
Gly Glu Thr Leu Glu Ile Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Ala Leu Asp Asn		
	420	425
Gln Asn Leu Arg Gln Leu Trp Asp Trp Ser Lys His Asn Leu Thr Ile		
	435	440
Thr Gln Gly Lys Leu Phe Phe His Tyr Asn Pro Lys Leu Cys Leu Ser		
	450	455
Glu Ile His Lys Met Glu Glu Val Ser Gly Thr Lys Gly Arg Gln Glu		
465	470	475
Arg Asn Asp Ile Ala Leu Lys Thr Asn Gly Asp Gln Ala Ser Cys Glu		
	485	490
Asn Glu Leu Leu Lys Phe Ser Tyr Ile Arg Thr Ser Phe Asp Lys Ile		
	500	505
Leu Leu Arg Trp Glu Pro Tyr Trp Pro Pro Asp Phe Arg Asp Leu Leu		
	515	520
Gly Phe Met Leu Phe Tyr Lys Glu Ala Pro Tyr Gln Asn Val Thr Glu		
	530	535
Phe Asp Gly Gln Asp Ala Cys Gly Ser Asn Ser Trp Thr Val Val Asp		
545	550	555
Ile Asp Pro Pro Leu Arg Ser Asn Asp Pro Lys Ser Gln Asn His Pro		
	565	570
Gly Trp Leu Met Arg Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln Tyr Ala Ile Phe		
	580	585
Val Lys Thr Leu Val Thr Phe Ser Asp Glu Arg Arg Thr Tyr Gly Ala		
	595	600
Lys Ser Asp Ile Ile Tyr Val Gln Thr Asp Ala Thr Asn Pro Ser Val		
	610	615
Pro Leu Asp Pro Ile Ser Val Ser Asn Ser Ser Ser Gln Ile Ile Leu		
625	630	635
Lys Trp Lys Pro Pro Ser Asp Pro Asn Gly Asn Ile Thr His Tyr Leu		
	645	650
Val Phe Trp Glu Arg Gln Ala Glu Asp Ser Glu Leu Phe Glu Leu Asp		
	660	665
Tyr Cys Leu Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ser Arg Thr Trp Ser Pro Pro		
	675	680
Phe Glu Ser Glu Asp Ser Gln Lys His Asn Gln Ser Glu Tyr Glu Asp		
	690	695
Ser Ala Gly Glu Cys Cys Ser Cys Pro Lys Thr Asp Ser Gln Ile Leu		
705	710	715
Lys Glu Leu Glu Glu Ser Ser Phe Arg Lys Thr Phe Glu Asp Tyr Leu		
	725	730
His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Lys Thr Ser Ser Gly Thr Gly Ala		
	740	745
Glu Asp Pro Arg Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ser Leu Gly Asp Val Gly		
	755	760
Asn Val Thr Val Ala Val Pro Thr Val Ala Ala Phe Pro Asn Thr Ser		
	770	775
Ser Thr Ser Val Pro Thr Ser Pro Glu Glu His Arg Pro Phe Glu Lys		
785	790	795
		800

Val Val Asn Lys Glu Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg His Phe Thr
 805 810 815
 Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gln Ala Cys Asn Gln Asp Thr Pro Glu Glu
 820 825 830
 Arg Cys Ser Val Ala Ala Tyr Val Ser Ala Arg Thr Met Pro Glu Ala
 835 840 845
 Lys Ala Asp Asp Ile Val Gly Pro Val Thr His Glu Ile Phe Glu Asn
 850 855 860
 Asn Val Val His Leu Met Trp Gln Glu Pro Lys Glu Pro Asn Gly Leu
 865 870 875 880
 Ile Val Leu Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Arg Tyr Gly Asp Glu Glu Leu
 885 890 895
 His Leu Cys Val Ser Arg Lys His Phe Ala Leu Glu Arg Gly Cys Arg
 900 905 910
 Leu Arg Gly Leu Ser Pro Gly Asn Tyr Ser Val Arg Ile Arg Ala Thr
 915 920 925
 Ser Leu Ala Gly Asn Gly Ser Trp Thr Glu Pro Thr Tyr Phe Tyr Val
 930 935 940
 Thr Asp Tyr Leu Asp Val Pro Ser Asn Ile Ala Lys Ile Ile Ile Gly
 945 950 955 960
 Pro Leu Ile Phe Val Phe Leu Phe Ser Val Val Ile Gly Ser Ile Tyr
 965 970 975
 Leu Phe Leu Arg Lys Arg Gln Pro Asp Gly Pro Leu Gly Pro Leu Tyr
 980 985 990
 Ala Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Leu Ser Ala Ser Asp Val Phe Pro Cys
 995 1000 1005
 Ser Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp Glu Val Ser Arg Glu Lys Ile Thr
 1010 1015 1020
 Leu Leu Arg Glu Leu Gly Gln Gly Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly
 1025 1030 1035 1040
 Asn Ala Arg Asp Ile Ile Lys Gly Glu Ala Glu Thr Arg Val Ala Val
 1045 1050 1055
 Lys Thr Val Asn Glu Ser Ala Ser Leu Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu
 1060 1065 1070
 Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Gly Phe Thr Cys His His Val Val Arg
 1075 1080 1085
 Leu Leu Gly Val Val Ser Lys Gly Gln Pro Thr Leu Val Val Met Glu
 1090 1095 1100
 Leu Met Ala His Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro
 1105 1110 1115 1120
 Glu Ala Glu Asn Asn Pro Gly Arg Pro Pro Pro Thr Leu Gln Glu Met
 1125 1130 1135
 Ile Gln Met Ala Ala Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala
 1140 1145 1150
 Lys Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala
 1155 1160 1165
 His Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile
 1170 1175 1180
 Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu Leu Pro Val
 1185 1190 1195 1200
 Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val Phe Thr Thr Ser
 1205 1210 1215
 Ser Asp Met Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Thr Ser Leu
 1220 1225 1230
 Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn Glu Gln Val Leu Lys Phe
 1235 1240 1245
 Val Met Asp Gly Gly Tyr Leu Asp Gln Pro Asp Asn Cys Pro Glu Arg
 1250 1255 1260
 Val Thr Asp Leu Met Arg Met Cys Trp Gln Phe Asn Pro Asn Met Arg
 1265 1270 1275 1280
 Pro Thr Phe Leu Glu Ile Val Asn Leu Leu Lys Asp Asp Leu His Pro
 1285 1290 1295
 Ser Phe Pro Glu Val Ser Phe Phe His Ser Glu Glu Asn Lys Ala Pro

1300 1305 1310
 Glu Ser Glu Glu Leu Glu Met Glu Phe Glu Asp Met Glu Asn Val Pro
 1315 1320 1325
 Leu Asp Arg Ser Ser His Cys Gln Arg Glu Glu Ala Gly Gly Arg Asp
 1330 1335 1340
 Gly Gly Ser Ser Leu Gly Phe Lys Arg Ser Tyr Glu Glu His Ile Pro
 1345 1350 1355 1360
 Tyr Thr His Met Asn Gly Gly Lys Lys Asn Gly Arg Ile Leu Thr Leu
 1365 1370 1375
 Pro Arg Ser Asn Pro Ser
 1380

<210> 54
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Ser Lys Trp Tyr
 115 120 125
 Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 210 215 220
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255
 Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 260 265 270
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 370 375 380
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 55
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 atgggatggt cctgtatcat cctgtttctg gtggccacag caactggcgt gcactctcag 60
 gtccagctgg tgcagagcgg cgcagaggtg aagaagcccg gagctagcgt caaggtctcc 120
 tgcaaggctt caggctacac attcaccgac tactacatga actgggtgag acaggctcca 180
 ggacagggcc tcgagtggat gggcaacatc aaccccaaca atggcgggac aaactacaac 240
 cagaagttca aggatcgctg gaccatgacc accgacacta gcacctcaac agcctacatg 300
 gagctgaggt ctctgcggag cgatgacact gccgtgtact actgtgccag gtggattctg 360
 tactacggga ggagcaagtg gtacttcgac gtctggggaa gagggacact agtgaccctg 420
 agcagcgcca gcaccaaggg cccagcgtg tccccctgg cccccagcag caagagcacc 480
 agcggcgcca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc 540
 gtgtcctgga acagcggagc cctgacaagc ggggtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 600
 agcagcggcc tgtacagcct gagcagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc 660
 cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaagggtg 720
 gagcccaaga gotgcgacaa gaccacacc tgccccctt gccctgcccc tgaactggcc 780
 ggagccccct ccgtgttctt gttccccccc aagcccaagg acaacctgat gatcagccgg 840
 acccccaggg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggacctga ggtgaagtgc 900
 aattggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagccccg ggaggaacag 960
 tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 1020
 ggcaaagaat acaagtcaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgcccccat cgagaaaacc 1080
 atcagaagg ccaaggcca gccagggaa cccaggtgt acacctgcc cccctcccg 1140
 gacgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggtt ctaccccgag 1200
 gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccaga acaactacaa gaccacccc 1260
 cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1320
 cgggtggcagc agggcaacgt gttagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1380
 tacaccaga agagcctgag cctgtcccc ggcaagtga 1419

<210> 56
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

Glu Trp Met Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Ser Lys Trp Tyr
 115 120 125
 Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 210 215 220
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255
 Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 260 265 270
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 340 345 350
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 370 375 380
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 57

<211> 1419

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

atgggatggt cctgtatcat cctgtttctg gtggccacag caactggcgt gcactctcag 60
 gtccagctgg tgcagagcgg cgcagaggtg aagaagcccg gagctagcgt caaggtctcc 120
 tgcaaggctt caggctacgc cttcaccgac tactacatga actgggtgag acaggctcca 180

```

ggacagggcc tcgagtggat gggcaacatc aaccccaaca atggcgggac aaactacaac 240
cagaagttca aggatcgctg gaccatgacc accgacacta gcacctcaac agcctacatg 300
gagctgaggt ctctgcgagg cgatgacact gccgtgtact actgtgccag gtggattctg 360
tactacggga ggagcaagtg gtacttcgac gtctggggaa gagggacact agtgaccctg 420
agcagcgcca gcaccaaggg cccagcgctg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 480
agcggcgcca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc 540
gtgtcctgga acagcggagc cctgacaagc ggggtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 600
agcagcgccc tgtacagcct gagcagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg 720
gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacac tgccccccct gccctgcccc tgaactggcc 780
ggagccccct ccgtgttctt gttccccccc aagcccaagg acacctgat gatcagccgg 840
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggacctga ggtgaagtgc 900
aattggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagccccg ggaggaacag 960
tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 1020
ggcaagaat acaagtgcaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgcccccat cgagaaaacc 1080
atcagcaagg ccaaggcca gccagggaa cccaggtgt acacctgcc cccctcccg 1140
gacgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggtt ctaccccg 1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc 1260
cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1320
cgggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1380
tacaccaga agagcctgag cctgtcccc ggaagtga 1419

```

<210> 58

<211> 717

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

```

atgggatggt cctgcatcat cctgttctctg gtggcaactg ccactggagt ccactccgac 60
atcgtcatga cccagagccc actgtcactc cccgtgacac ccgagagacc cgctagcatc 120
agctgtagaa gctcccagag catcgtgcag tctaacggcg atacctacct cgagtgttac 180
ctgcagaagc ccgacagtc tctcagctc ctgatttacc gcgtcagcaa tcgcttttcc 240
ggggtgcctg atcggtttag cggctcagga agcgggaaccg acttcaccct gaagatctca 300
aggggtggagg ctgaggatgt gggcgtgtac tactgttcc agggatctca cgtgccttac 360
accttcggac agggcacaaa gctcgagatt aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 420
atcttcccc ccagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgcctgctg 480
aacaacttct acccccgga ggccaagggt cagtggaaagg tggacaacgc cctgcagagc 540
ggcaacagcc aggaaagcgt caccgagcag gacagcaagg actccacct cagcctgagc 600
agcaccctga cactgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaggtg 660
accaccaggg gcctgtccag cccgtgacc aagagcttca accggggcga gtgctag 717

```

<210> 59

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa denota posições de CDR's na sequência de estrutura

<400> 59

```

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 Xaa Xaa
20          25          30
Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45
Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50          55          60
Xaa Xaa Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

```


Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 115 120

<210> 60
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Xaa denota posições de CDR's na sequência de estrutura

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

<210> 61
 <211> 356
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 caggtgcagc tgggtgcagag cggagccgag gtgaagaagc ctggcgccag cgtcaagggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactactaca tgaactgggt gcggcaggcc 120
 ccaggccagg gactggaatg gatgggcaac atcaacccca acaacggcgg caccaactac 180
 aaccagaagt tcaaggaccg ggtcaccatg accacgcaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc ccggtggatc 300
 ctgtactacg gccgggtcaa gtggtacttc gacgtgtggg gcaggggcac actagt 356

<210> 62
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 gacatcgtga tgaccagag cccctgagc ctgcccgtga cccctggcga gcccgccagc 60
 atcagctgca gaagcagcca gagcatcgtc cagagcaacg gcgacaccta cctggaatgg 120
 tatctgcaga agcccgcca gtccccccag ctgctgatct acagagttag caaccgggttc 180
 agcggcgtgc ccgacagatt cagcggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 agccgggtgg aggccgagga cgtgggctgt tactactgct ttcaaggcag ccacgtgccc 300
 tacaccttcg gccagggcac caagctggaa atcaagcgtg cg 342

<210> 63
 <211> 1012
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 63

```

actagtcacc gtgagcagcg ccagcaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccag 60
cagcaagagc accagcgcg gcacagccgc cctgggctgc ctgggtgaagg actacttccc 120
cgagcccgtg accgtgagct ggaacagcgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc 180
cgccgtgctg cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtgggtgaccg tgcccagcag 240
cagcctgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt 300
ggacaagaag gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc 360
ccctgagctg ctgggaggac ccgacgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct 420
gatgatcagc cggaccccc aggtgacctg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaggacct 480
tgaggtgaag ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggtg cacaacgcca agaccaagcc 540
ccgggaggaa cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgcctgacca 600
ggactggctg aacggcaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgccctgcccc 660
cgaggaaaag accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gaaccccagg tgtacacct 720
gccccctcc cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaagg 780
cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta 840
caagaccacc ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac 900
cgtggacaag agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcagaggc 960
cctgcacaac cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaagt ga 1012

```

<210> 64

<211> 336

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

```

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
1          5          10          15
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
20          25          30
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
35          40          45
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
50          55          60
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
65          70          75          80
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
85          90          95
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
100         105         110
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp
115         120         125
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
130         135         140
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
145         150         155         160
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
165         170         175
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
180         185         190
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
195         200         205
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr
210         215         220
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
225         230         235         240
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
245         250         255
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
260         265         270
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
275         280         285
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
290         295         300

```

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 305 310 315 320
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330 335

<210> 65
 <211> 1012
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 actagtcacc gtgagcagcg ccagcaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccag 60
 cagcaagagc accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc 120
 cgagcccgtg accgtgagct ggaacagcgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc 180
 cgccgtgctg cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgaccg tgcccagcag 240
 cagcctgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt 300
 ggacaagaag gtggagccca agagctgcca caagaccac acctgcccc cctgcccctgc 360
 ccctgagctg ctgggcccgc ccgacgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct 420
 gatgatcagc cggacccccg aggtgacctg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaggacct 480
 tgaggtgaag ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc 540
 ccgggaggaa cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca 600
 ggactggctg aacggcaaaag aatacaagt caaggtgtcc aacaaggccc tgcctctgcc 660
 cgaggaaaag accatcagca aggccaagg ccagcccagg gaaccccagg tgtacacct 720
 gccccctcc cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaagg 780
 cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta 840
 caagaccacc ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttcctgtaca gcaagctgac 900
 cgtggacaag agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc 960
 cctgcacaac cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaagt ga 1012

<210> 66
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 1 5 10 15
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 20 25 30
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 35 40 45
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 50 55 60
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 85 90 95
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 100 105 110
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp
 115 120 125
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 130 135 140
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 145 150 155 160
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 165 170 175
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 180 185 190
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 195 200 205
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr

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

```
<210> 67
<211> 1419
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400>	67						
atgggctggt	cctgcatcat	cctgtttctg	gtggccaccg	ccaccggcgt	gcacagccag	60	
gtgcagctgg	tgcagagcgg	agccgaggtg	aagaagcctg	gcgccagcgt	caagggtgcc	120	
tgcaaggcca	gcggctacac	cttcaccgac	tactacatga	actgggtgcg	gcaggcccca	180	
ggccagggac	tggaatggat	gggcaacatc	aaccccaaca	acggcggcac	caactacaac	240	
cagaagtcca	aggaccgggt	caccatgacc	accgacacca	gcaccagcac	cgccatcatg	300	
gaactgcgga	gcctgagaag	cgacgacacc	gccgtgtact	actgcgcgcc	gtggatcctg	360	
tactacggcc	ggtccaagtg	gtacttcgac	gtgtggggca	ggggcacact	agtcaccgtg	420	
agcagcgcca	gcaccaaggg	ccccagcgtg	ttccccctgg	ccccagcag	caagagcacc	480	
agcggcggca	cagccgccct	gggctgcctg	gtgaaggact	aettccccga	gcccgtagcc	540	
gtgagctgga	acagcggagc	cctgacctcc	ggcgtgcaca	ccttccccgc	cgtgctgcag	600	
agcagcggcc	tgtacagcct	gagcagcgtg	gtgaccgtgc	ccagcagcag	cctgggcacc	660	
cagaccata	tctgcaacgt	gaaccacaag	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagaaggtg	720	
gagcccaaga	gctgcgacaa	gaccacaacc	tgccccccct	gccctgcccc	tgagctgctg	780	
ggcggaccgg	acgtgttcc	gttccccccc	aagcccaagg	acaccttgat	gatcagcgg	840	
acccccgagg	tgacctgcgt	gggtggtggac	gtgagccacg	aggacctga	ggtagaagtc	900	
aattggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	aacgccaaga	ccaagccccg	ggaggaacag	960	
tacaacagca	cctaccgggt	ggtgtccgtg	ctgaccgtgc	tgcaccagga	ctggctgaac	1020	
ggcaaagaat	acaagtgcaa	ggtgtccaac	aaggccctgc	ctgcccccca	ggaaaagacc	1080	
atcagcaag	ccaagggcca	gcccagggaa	ccccaggtgt	acaccctgcc	cccctcccgg	1140	
gacgagctga	ccaagaacca	ggtgtccctg	acctgtctgg	tgaagggtt	ctaccccagc	1200	
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaacggc	cagcccagaga	acaactacaa	gaccaccccc	1260	
cctgtgctgg	acagcgacgg	cagcttcttc	ctgtacagca	agctgaccgt	ggacaagagc	1320	
cgggtggcagc	agggcaacgt	gttcagctgc	agcgtgatgc	acgaggccct	gcacaaccac	1380	
tacaccaga	agagcctgag	cctgtccccc	ggcaagtga			1419	

```
<210> 68
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

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

65					70					75				80
Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr
				85					90					95
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala
			100					105					110	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Ile	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ser	Lys	Trp
		115					120					125		
Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
	130					135					140			
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
145					150					155				160
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
				165				170						175
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
		180					185						190	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
	195					200						205		
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
	210					215					220			Ile
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
225					230					235				240
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
				245					250					255
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
		260					265						270	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
	275						280					285		
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
	290					295					300			
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
305					310					315				320
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
				325					330					335
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
		340						345					350	
Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
		355					360						365	
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
	370					375					380			
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
385					390					395				400
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
				405					410					415
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
			420					425					430	
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
		435					440					445		
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
	450					455					460			Lys
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
465					470									

<210> 69

<211> 717

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 69

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgac 60
atcgtgatga cccagagccc cctgagcctg cccgtgaccg ctggcgagcc cgccagcatc 120
agctgcagaa gcagccagag catcgtccag agcaacggcg acacctacct ggaatggat 180
ctgcagaagc cgggccagtc ccccagctg ctgatctaca gagtgagcaa ccggttcagc 240

```

```

ggcgtgcccc acagattcag cggcagcggc tccggcaccg acttcaccct gaagatcagc 300
cgggtggagg ccgaggacgt gggcgtgtac tactgctttc aaggcagcca cgtgccctac 360
accttcggcc agggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggccgcccc cagcgtgttc 420
atcttcccc ccagcgatga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 480
aacaacttct acccccggga ggccaaggtg cagtggaaagg tggacaatgc cctgcagagc 540
ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 600
agcacctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 660
acccaccagg gcctgtccag ccccgtagacc aagagcttca accggggcga gtgctga 717

```

<210> 70

<211> 1422

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60
gtgcagctgg tgcagagcgg agcagaggtg aagaagcctg gcgccagcgt caaggtgtcc 120
tgcaaggcca gcggtacac ctacccgac tactacatga actgggtgcg gcaggcccca 180
ggccagggac tggaaatggat gggcaacatc aacccaaca acggcggcac caactacaac 240
cagaagttca aggaccgggt caccatgacc accgacacca gcaccagcac cgcctacatg 300
gaactgcgga gcctgagaag cgacgacacc gccgtgtact actgcgcccg gtggatcctg 360
tactacggcc ggtccaagtg gtacttcgac gtgtggggca ggggcacact agtgaccgtg 420
tccagcgcca gcaccaagg cccagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 480
agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga accggtgacc 540
gtgtcctgga acagcggagc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgtgcag 600
agcagcggcc tgtacagcct gagcagcgtg gtgaccgtgc ccagcagcag cctgggcacc 660
cagacctaca tctgtaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg 720
gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgccccccct gccctgcccc cgagctgctg 780
ggaggcccca gcgtgttcct gttcccccc aagcctaagg acaccctgat gatcagcaga 840
acccccgagg tgacctgtgt ggtggtggt gtgagccacg aggaccctga ggtgaagttc 900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaga ccaagcccag ggaggagcag 960
tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggtgaac 1020
ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgcccctat cgagaaaacc 1080
atcagcaagg ccaagggcca gccagagag cccaggtgt acaccctgcc ccctagcaga 1140
gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tgaagggcct ctaccccagc 1200
gacatgcgag tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc 1260
cctgtgtctg acagcgatgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1320
agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac 1380
tacaccagga agagcctgag cctgtcccc ggaagtgat ga 1422

```

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que especificamente se liga em IGF-1R compreendendo CDRH3 de SEQ. ID. NO: 1 ou sua variante que contém 1 ou 2 substituições de aminoácido na CDRH3.

2. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os resíduos de aminoácido de SEQ. ID. NO: 1 diferem por uma substituição em uma ou mais posições selecionadas de 7 e 9.

3. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os resíduos de aminoácido de SEQ. ID. NO: 1 diferem por uma ou mais substituições selecionadas de R a S na posição 7 e K a R na posição 9.

4. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno adicionalmente compreende uma ou mais das seguintes seqüências CDRH2: SEQ. ID. NO: 2 ou CDRH1: SEQ. ID. NO: 3, CDRL1: SEQ. ID. NO: 4, CDRL2: SEQ. ID. NO: 7 e CDRL3: SEQ. ID. NO: 6.

5. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que uma ou mais das CDR's podem ser substituídas por uma variante das mesmas, cada CDR variante contendo 1 ou 2 substituições de aminoácido.

6. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 4 ou reivindicação 5, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender CDRH1 de SEQ. ID. NO: 3.

7. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 4 ou reivindicação 5, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender CDRL2 de SEQ. ID. NO: 7.

8. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender as seguintes CDRs:

CDRH1:SEQ. ID. NO: 3

5 CDRH2: SEQ. ID. NO: 2

CDRH3: SEQ. ID. NO: 1

CDRL1:SEQ. ID. NO: 4

CDRL2: SEQ. ID. NO: 7

CDRL3: SEQ. ID. NO: 6.

10 9. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que especificamente se liga em IGF-1R e compreende uma região variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO: 8 e uma região variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO: 9.

15 10. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que especificamente se liga em IGF-1R e compreende uma região variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO: 10 e uma região variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO: 11.

20 11. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que especificamente se liga em IGF-1R e compreende uma região variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO: 12 e uma região variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO: 13.

25 12. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que especificamente se liga em IGF-1R e compreende um domínio de região variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO: 14 e um domínio de região variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO: 16.

13. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo caracterizado pelo fato de que especificamente se liga em IGF-1R e compreende uma região variável de cadeia pesada de SEQ. ID. NO:15 e uma região variável de cadeia leve de SEQ. ID. NO:16.

14. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende CDRs como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 ou regiões variáveis de cadeia pesada ou leve como definidas em qualquer uma das reivindicações 9 a 13, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno é de rato, camundongo, primata (eg cinomolgo, macaco do Velho Mundo ou Macaco Antropóide Grande) ou humano.

15. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico ou humanizado.

16. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno adicionalmente se liga em IGF-1R de primata.

17. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região constante.

18. Anticorpo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região constante de isótipo IgG.

19. Anticorpo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é IgG1.

20. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de compreender uma região de domínio constante de tal modo que o anticorpo tem uma ADCC e/ou ativação de complemento ou funcionalidade efetora reduzida.

21. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de compreender um domínio constante ou domínio constante mutado com um perfil de glicosilação alterado de tal modo que o anticorpo tem ativação de complemento e/ou ADCC / funções efetoras

intensificadas.

22. Fragmento de ligante de antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o fragmento é um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacorpo, triacorpo, tetracorpo, minianticorpo, minicorpo, VH isolado ou VL isolado.

23. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21 ou fragmento de ligante de antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo é capaz de pelo menos alguma função efetora por exemplo onde ele é capaz de alguma função de ADCC ou CDC.

24. Célula hospedeira recombinante transformada, transfectada ou transduzida, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos um cassete de expressão, por meio do qual dito cassete de expressão compreende um polinucleotídeo codificador de uma cadeia pesada de anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a invenção aqui descrita e adicionalmente compreende um polinucleotídeo codificador de uma cadeia leve de anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a invenção aqui descrita.

25. Célula hospedeira recombinante transformada, transfectada ou transduzida, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos um cassete de expressão, por meio do qual um primeiro cassete de expressão compreende um polinucleotídeo codificador de uma cadeia pesada de anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a invenção aqui descrita e adicionalmente compreende um segundo cassete de expressão que compreende um polinucleotídeo codificador de uma cadeia leve de anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com a invenção aqui descrita.

26. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 24 ou reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a célula é eucariótica.

27. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que a célula é de mamífero.

28. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que a célula é CHO ou NSO.

5 29. Método para a produção de anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 21 ou de fragmento de ligante de antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1-22, caracterizado pelo fato de compreender a etapa de cultivar a célula hospedeira como definida em qualquer uma das reivindicações 24-28 em um meio de
10 cultura livre de soro.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que dito anticorpo é secretado por dita célula hospedeira para dentro do meio de cultura.

15 31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que dito anticorpo está adicionalmente purificado para pelo menos 95% ou mais (e.g. 98% ou mais) com respeito ao dito anticorpo contendo meio de cultura.

20 32. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes e um veículo farmaceuticamente aceitável.

33. Kit-de-partes, caracterizado pelo fato de compreender a composição como definida na reivindicação 32 juntamente com instruções para uso.

25 34. Uso de anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 33 ou de composição como definida na reivindicação 32, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para o tratamento de um paciente humano afligido com câncer.

35. Uso de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o paciente está afligido com câncer de mama.

36. Uso de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o paciente está afligido com câncer de próstata.

5 37. Uso de anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para o tratamento de uma doença ou de um distúrbio selecionada(o) do grupo consistindo de: artrite reumatóide, câncer de mama, câncer de próstata, câncer
10 de pulmão ou mieloma.

38. Anticorpo ou fragmento de ligante de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, caracterizado pelo fato de que o anticorpo neutraliza a atividade de IGF-1R.

FIG. 1

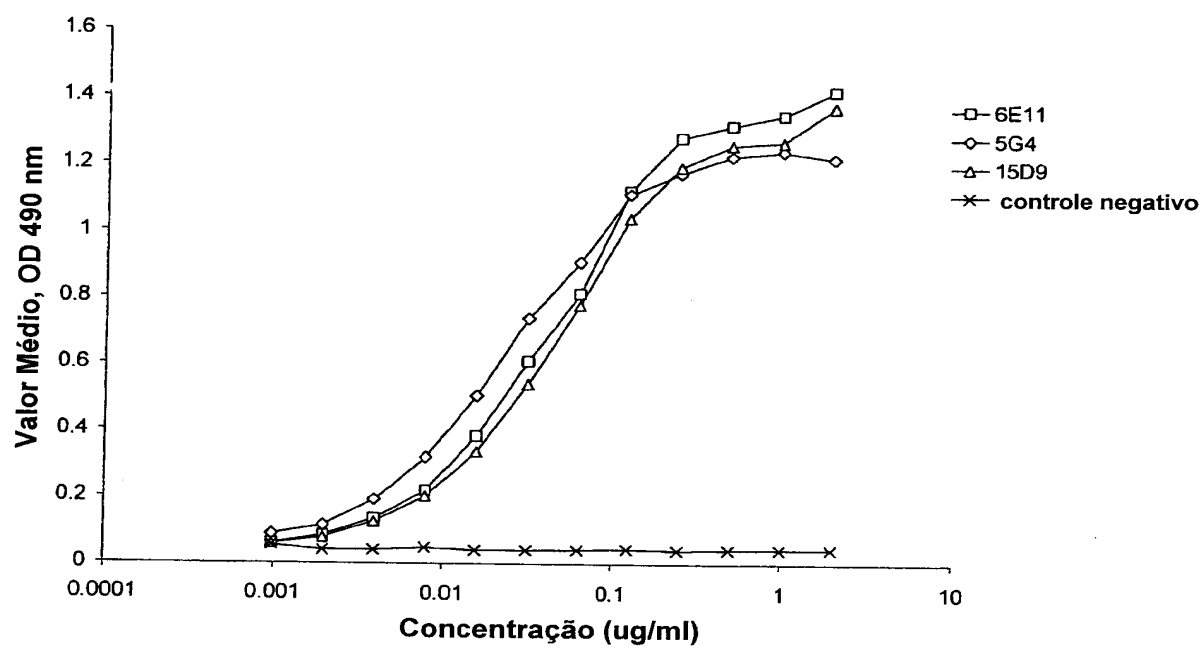


FIGURA 2

Figura 2A - ELISA de ligação - anticorpos purificados

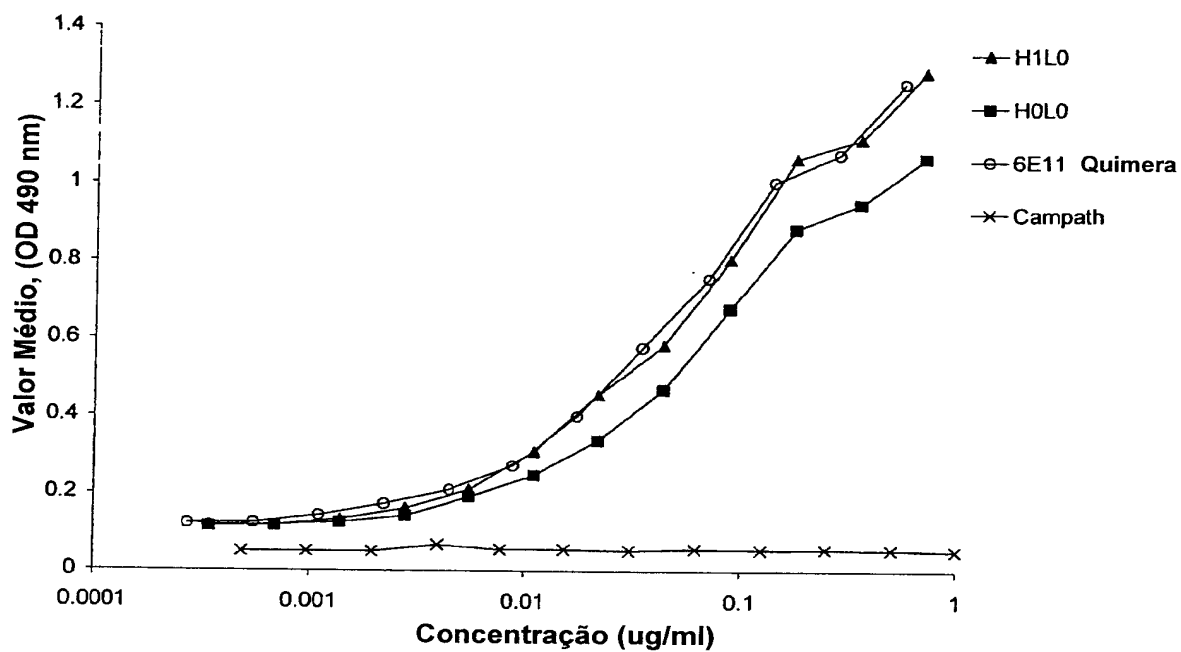


Figura 2B - ELISA de ligação - anticorpos purificados

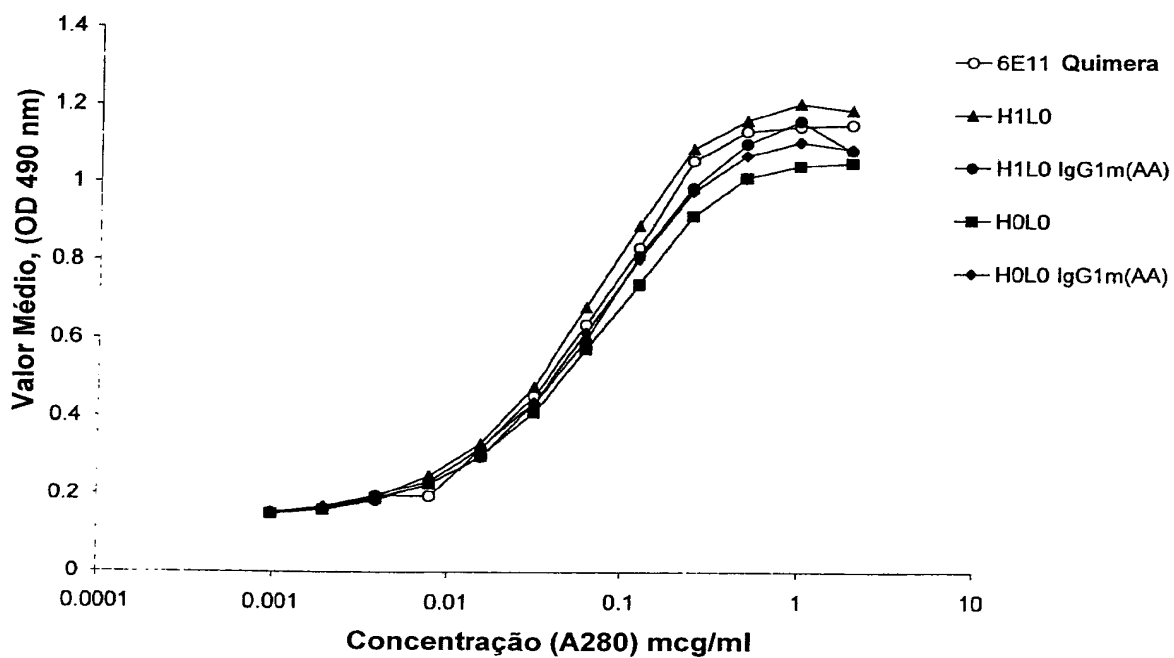


Figura 2C - ELISA de ligação - anticorpos purificados

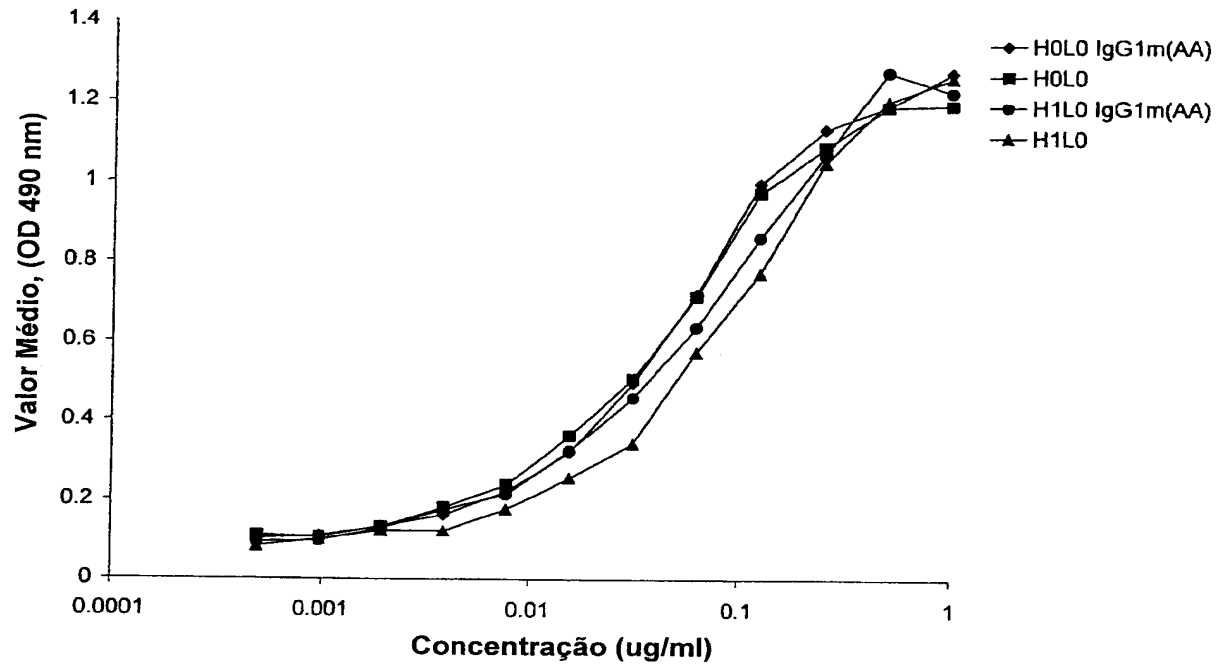


Figura 2D - ELISA de ligação - anticorpos purificados

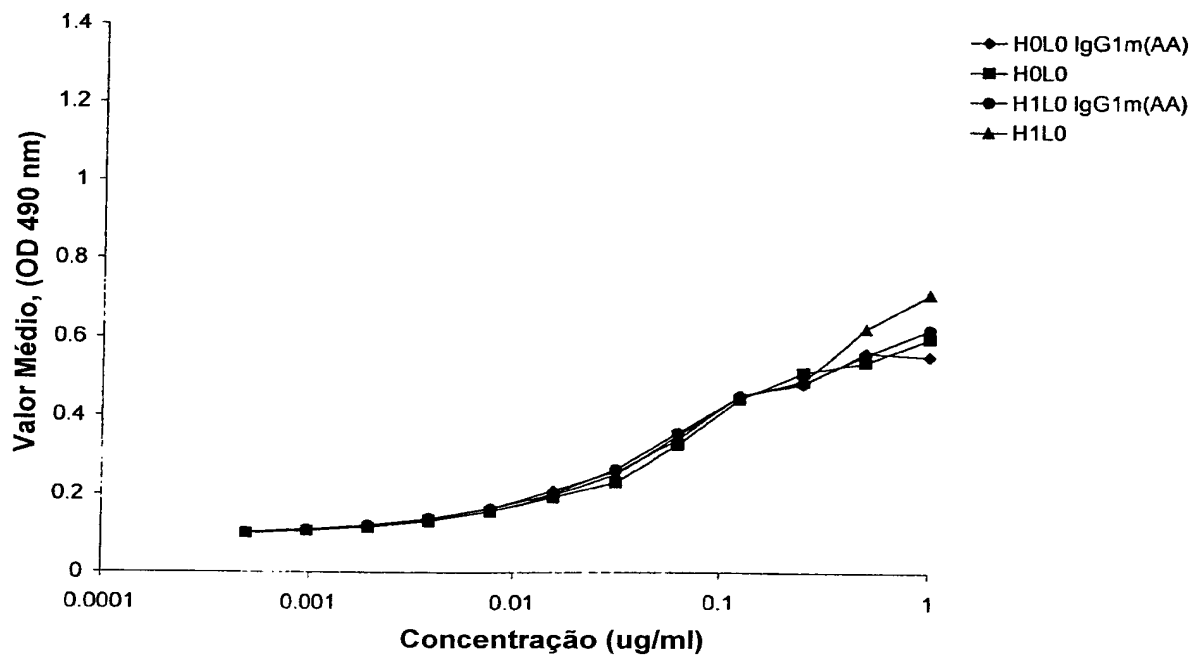


Figura 2E - ELISA de ligação

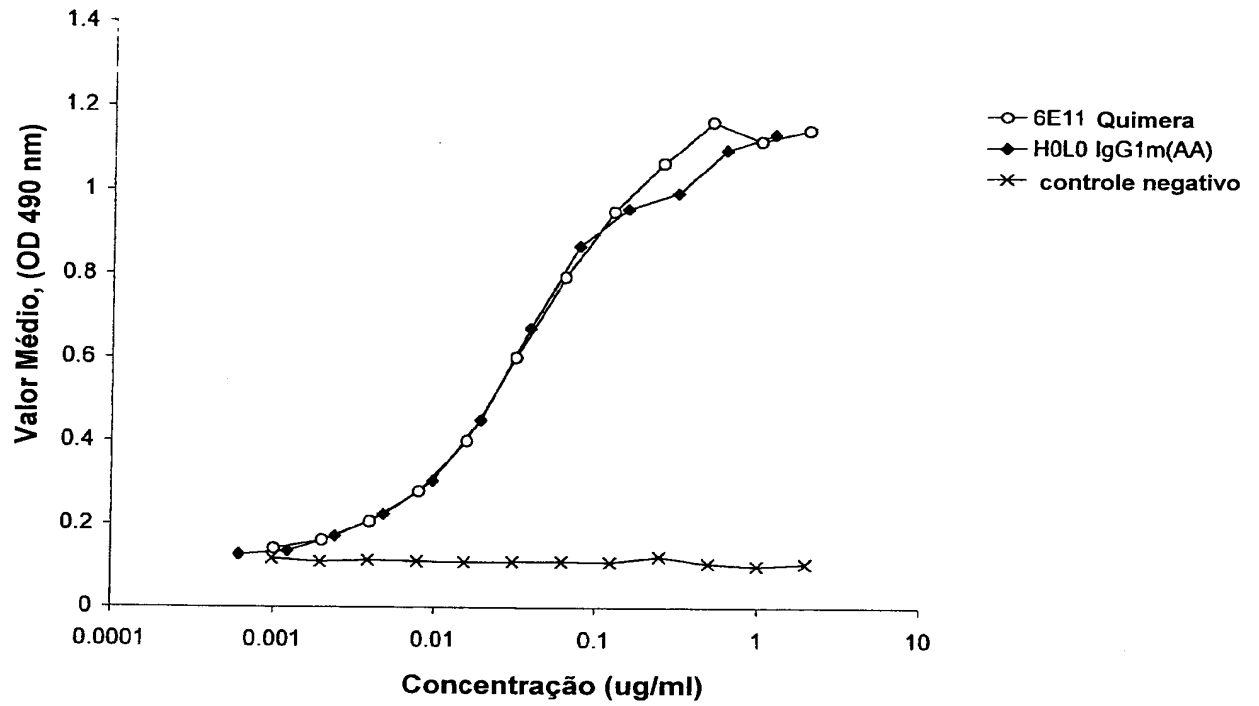


FIG. 3

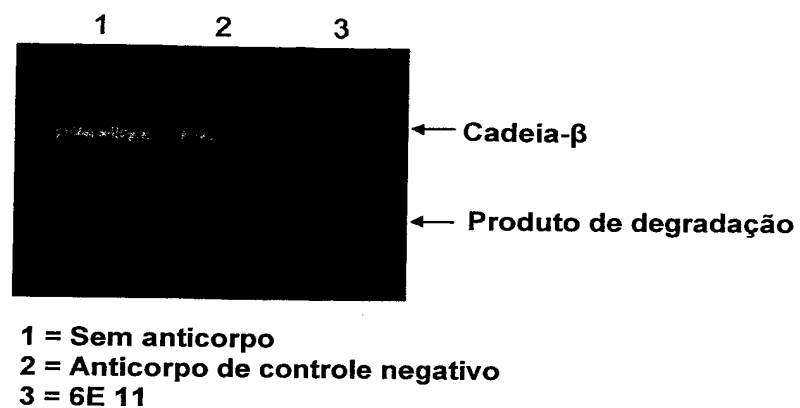


FIG. 4

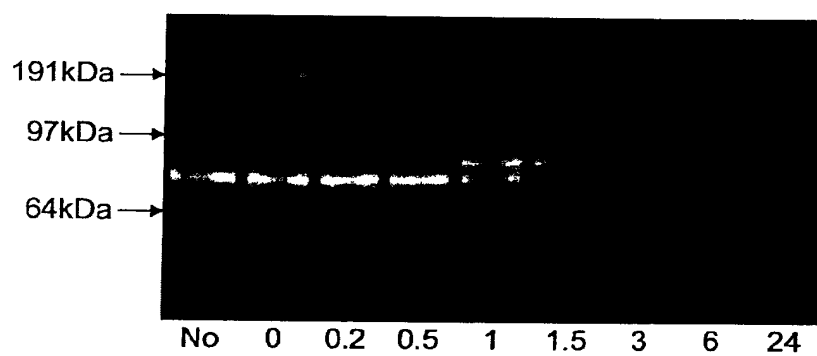


FIG. 5

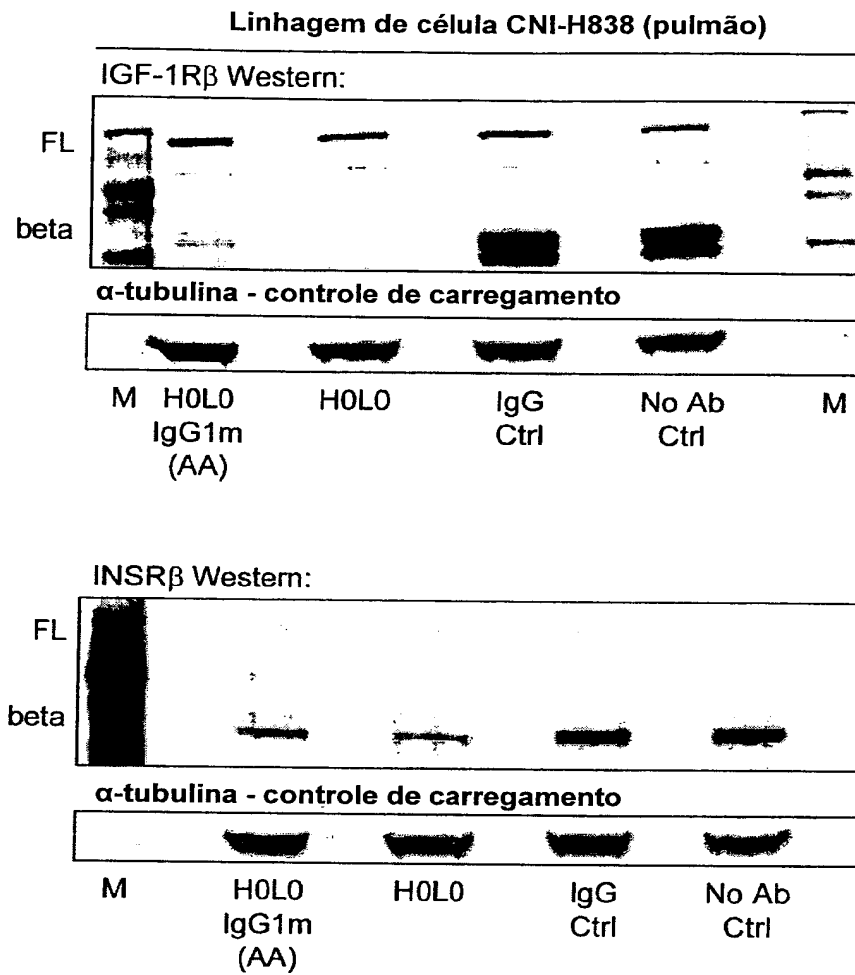


FIG. 6

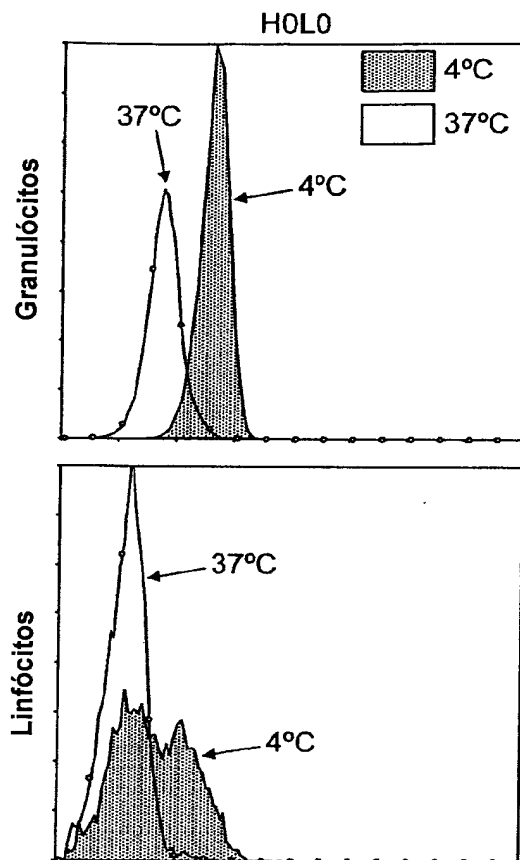


FIG. 7

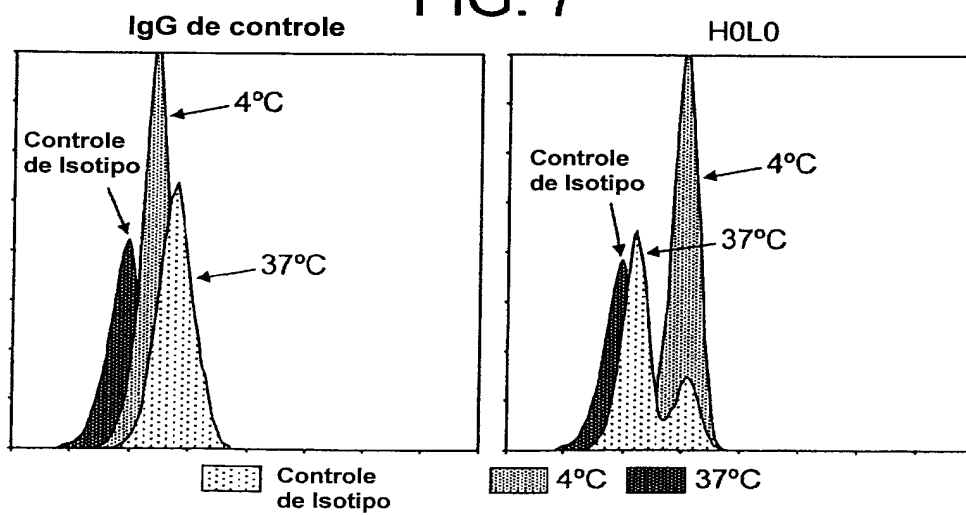


FIG. 8

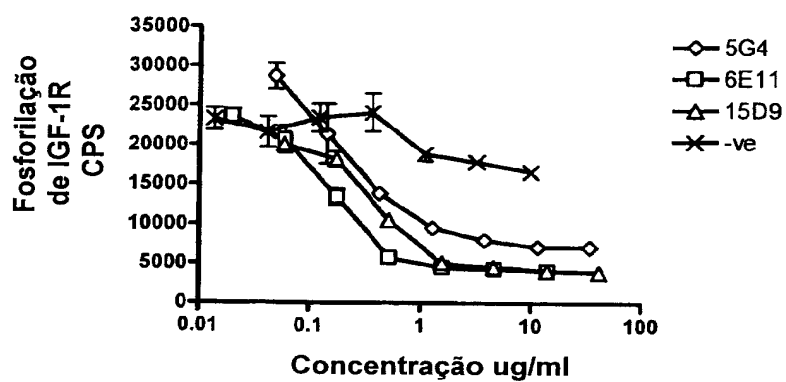


FIG. 9

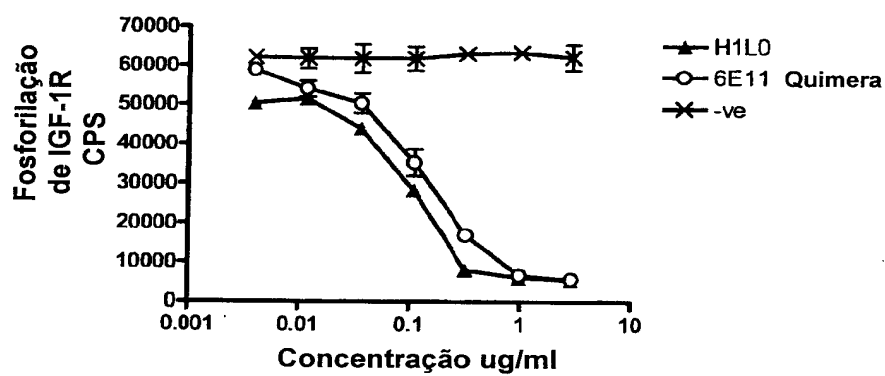


FIG. 10

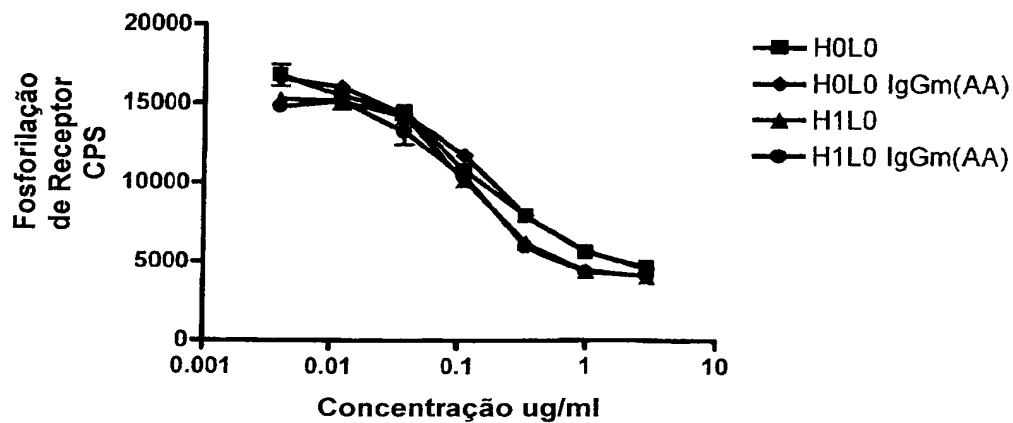


FIG. 11A

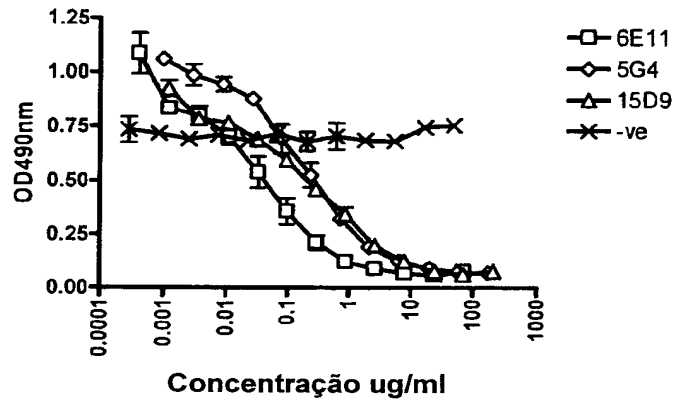


FIG. 11B

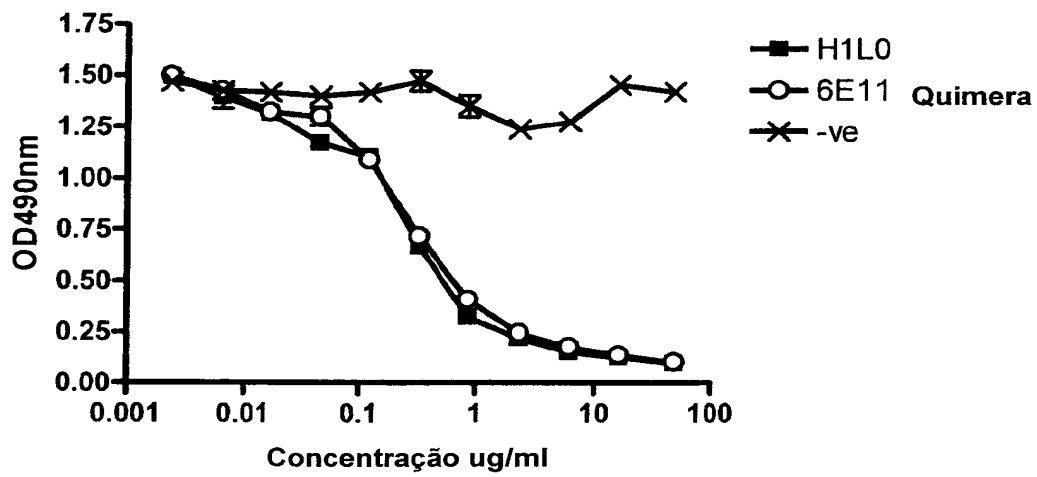


FIG. 12A

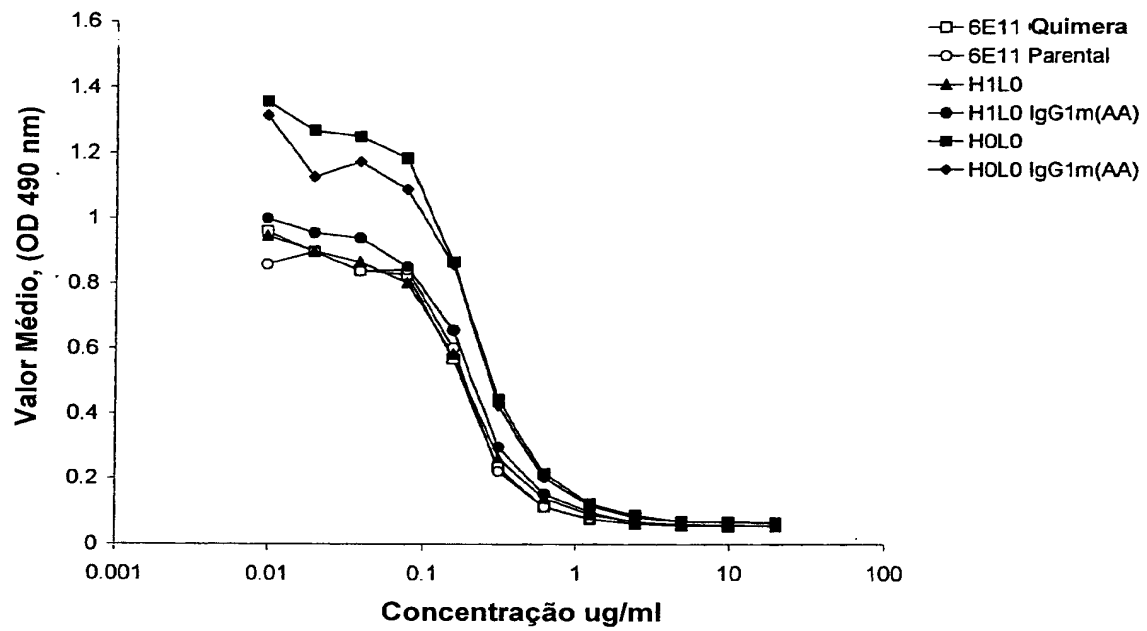


FIG. 12B

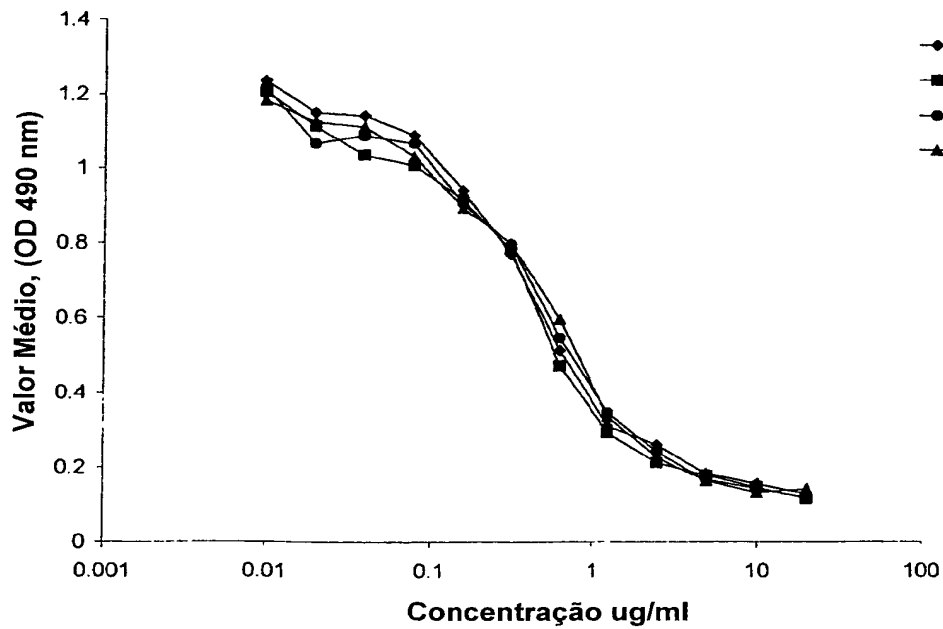


FIG. 12C

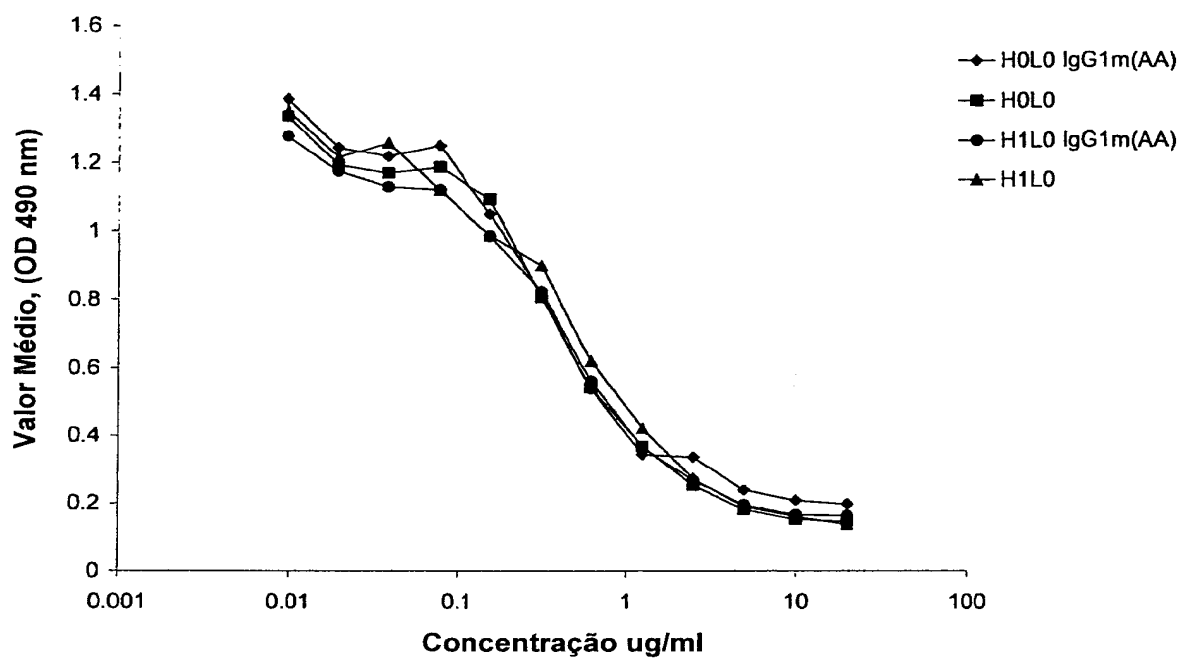


FIG. 13A

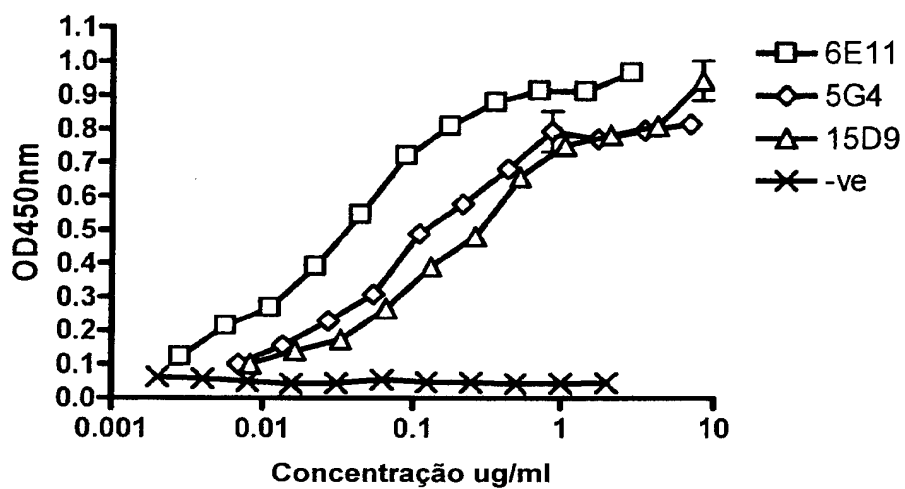


FIG. 13B

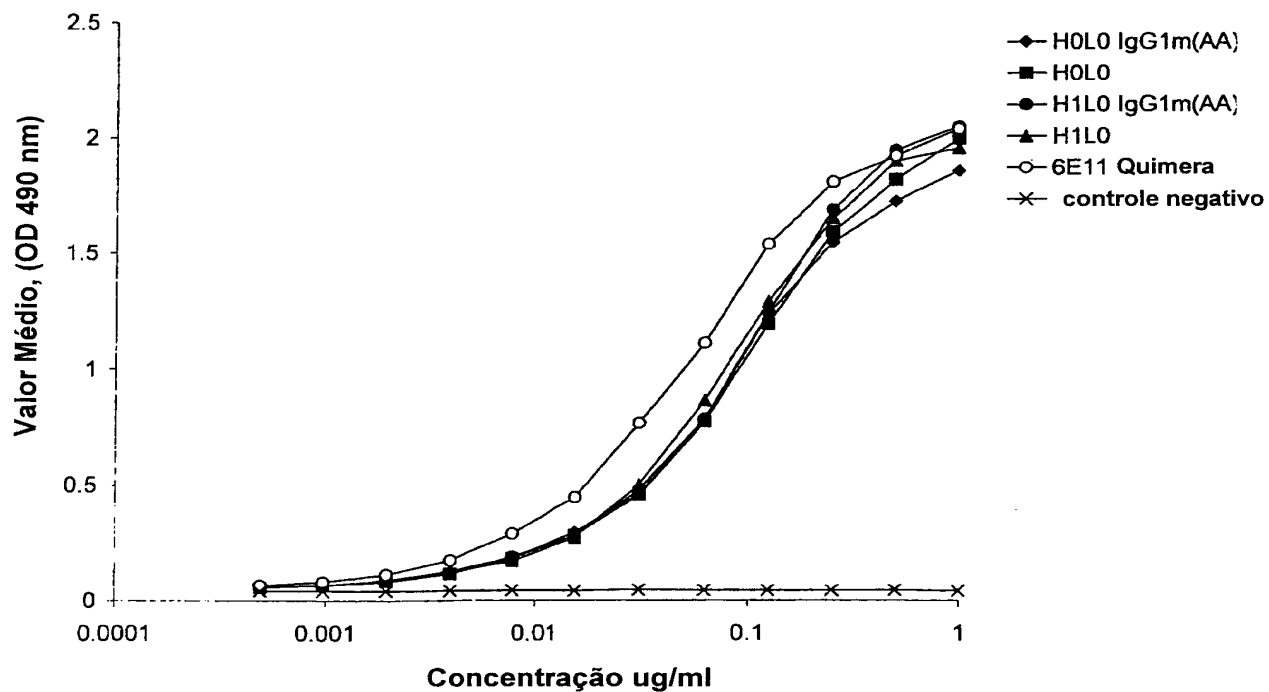


FIG. 14

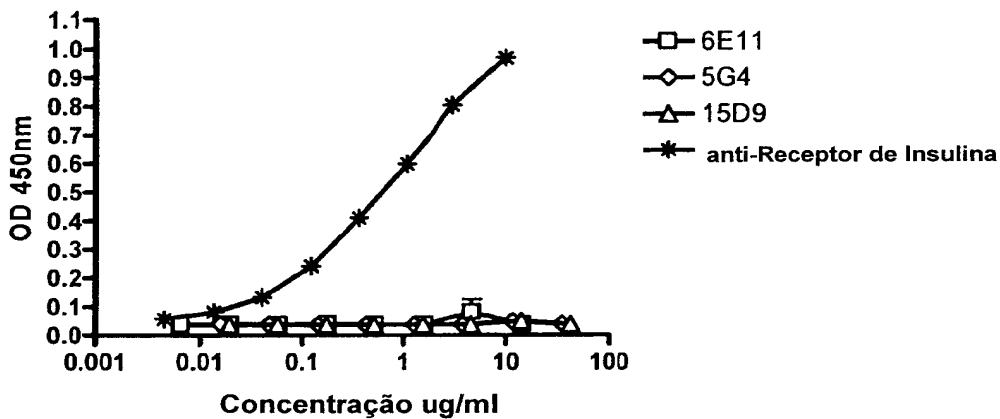


FIG. 15

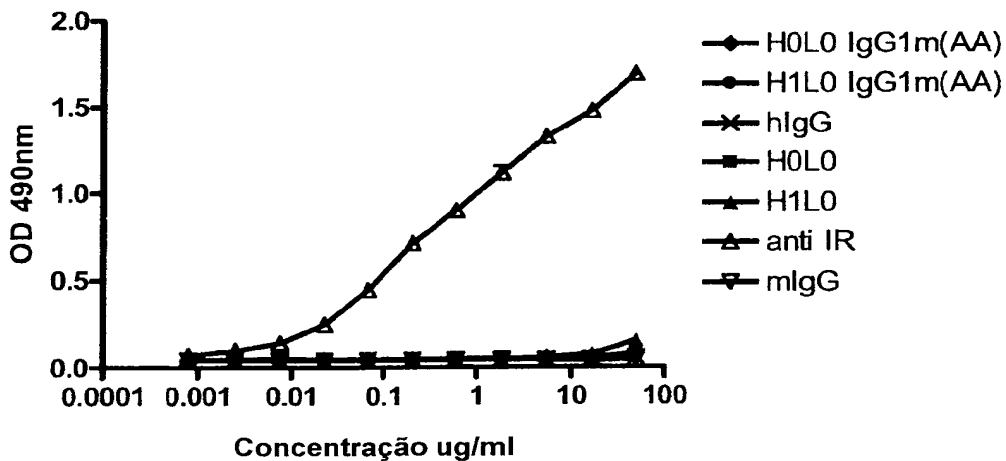


FIG. 16

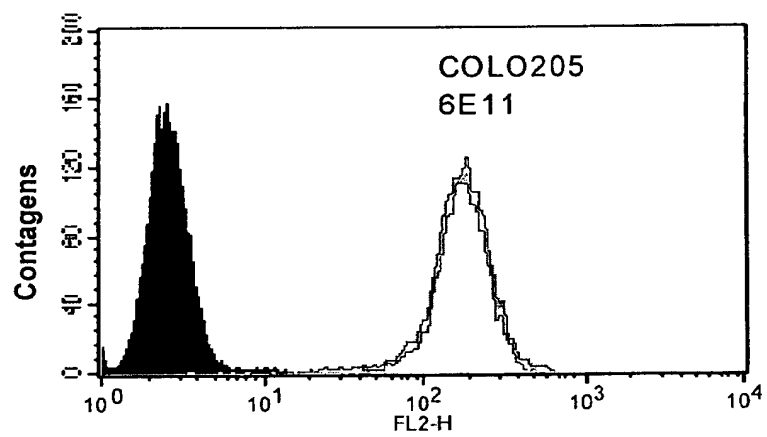
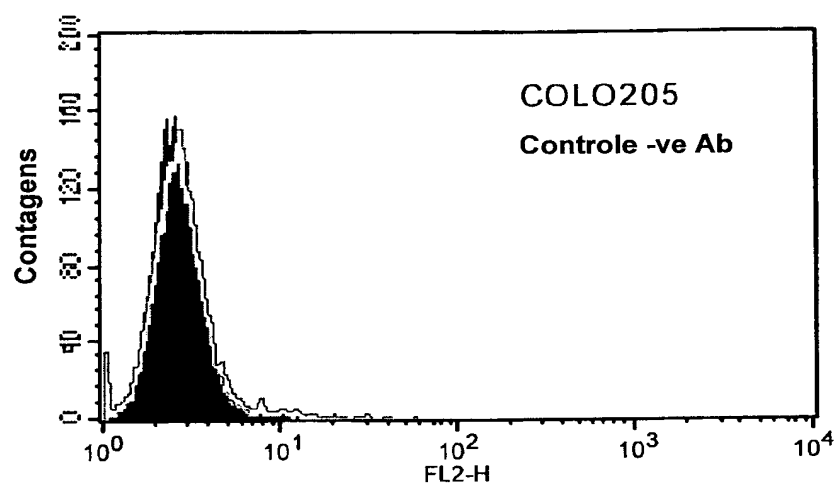


FIG. 17

NCI-H838

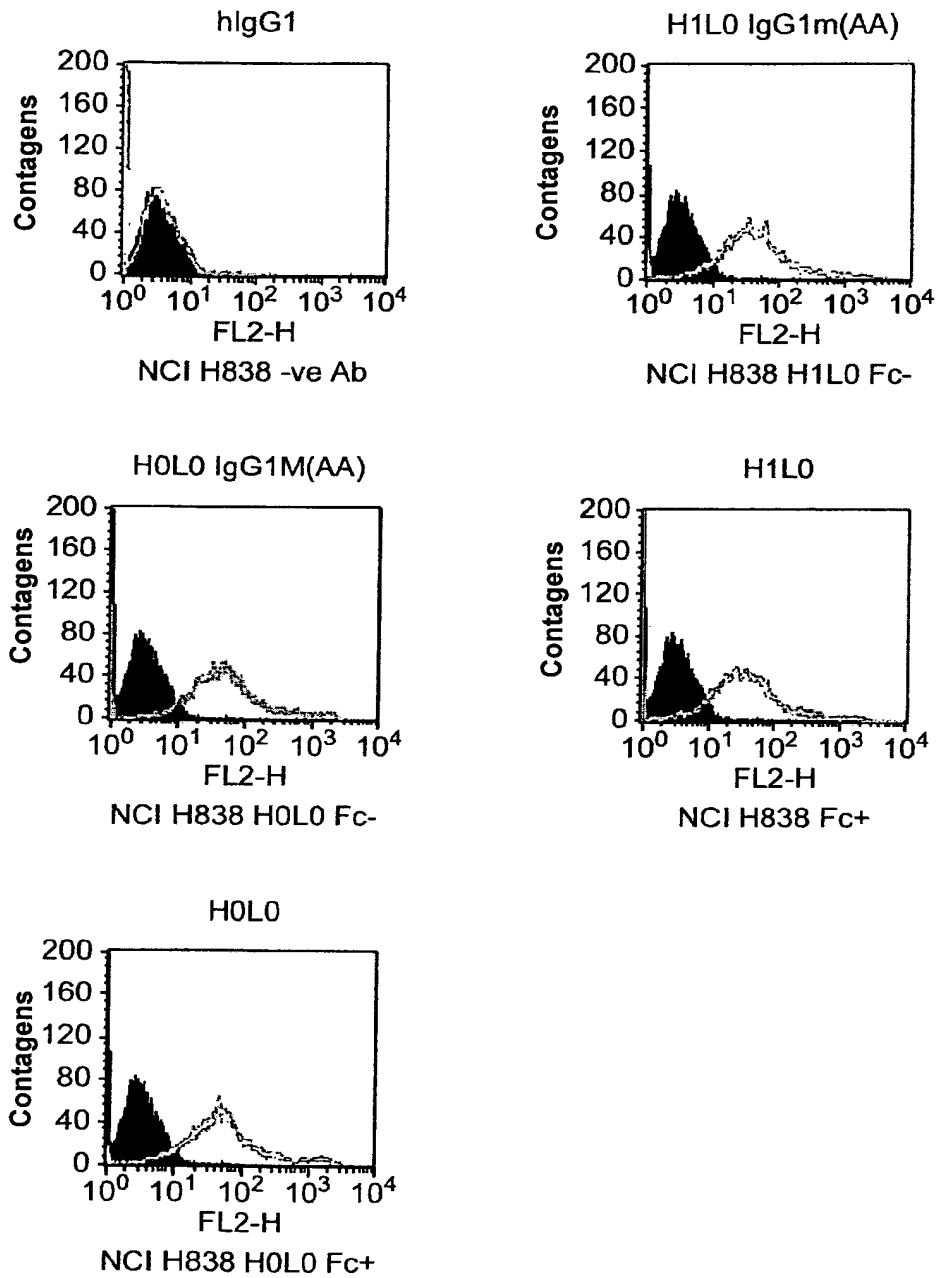


FIG. 18

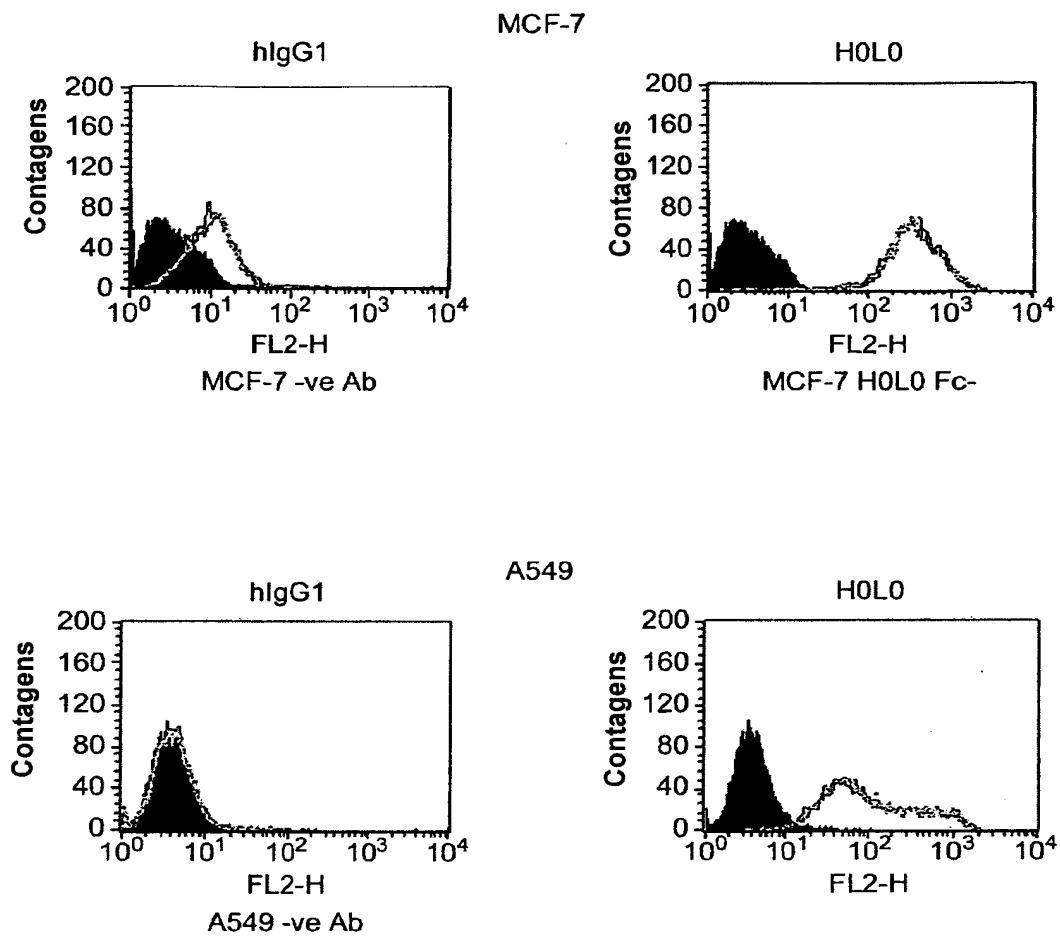
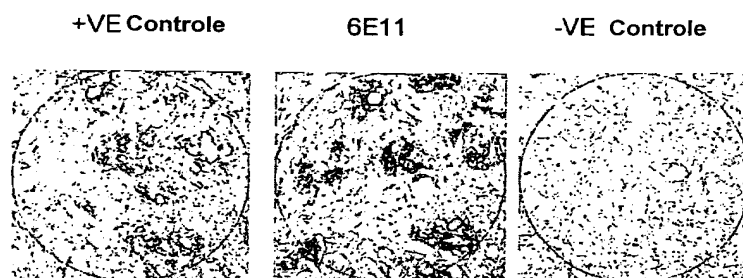
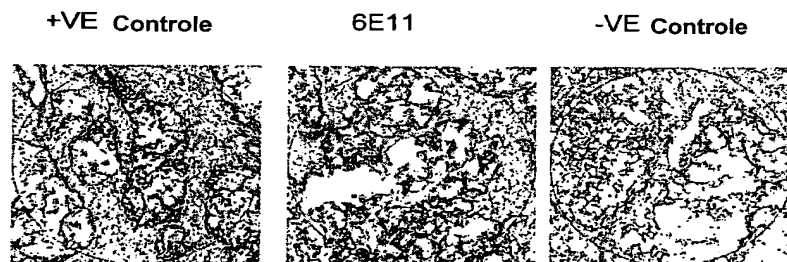


FIG. 19

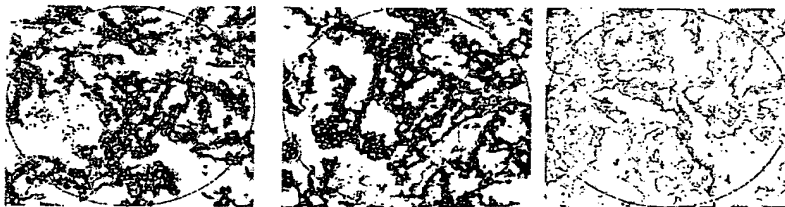
Tecido de próstata canceroso (31824C1) corado com 4 µg/ml de anticorpo



Tecido de próstata "normal" adjacente (31824D1) corado com 4 µg/ml de anticorpo

FIG. 20

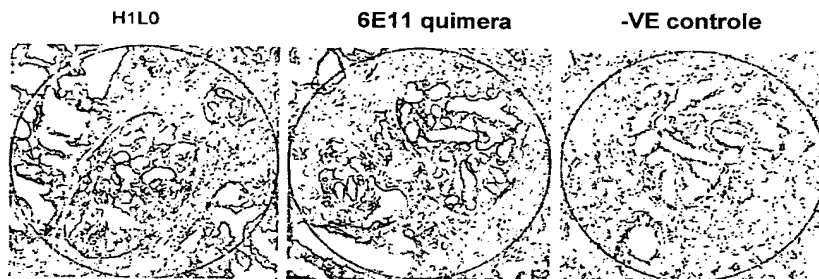
Tecido de mama: 16943a1d corado com 4 µg/ml de anticorpo



Tecido de mama: 17690a1d corado com 4 µg/ml de anticorpo



Tecido de mama: 16945a1o corado com 4 µg/ml de anticorpo

FIG. 21

Tecido canceroso de próstata de humano 41824C1 corado com 100 µg/ml de anticorpo



Tecido normal de próstata de humano 31824D1 corado com 100 µg/ml de anticorpo

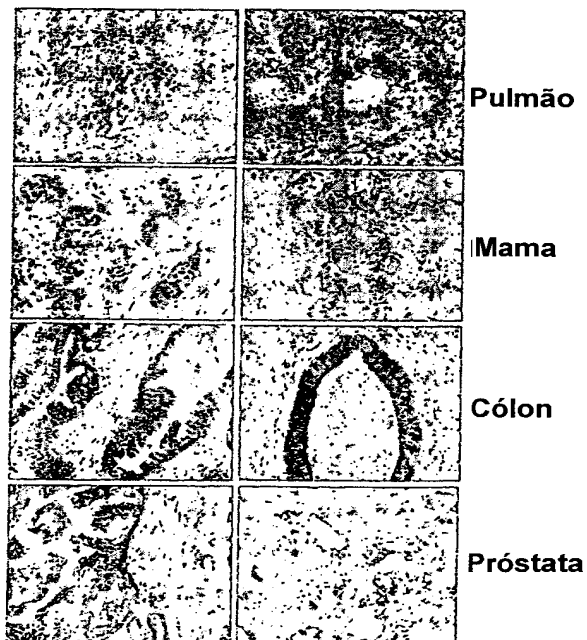
FIG. 22

FIG. 23

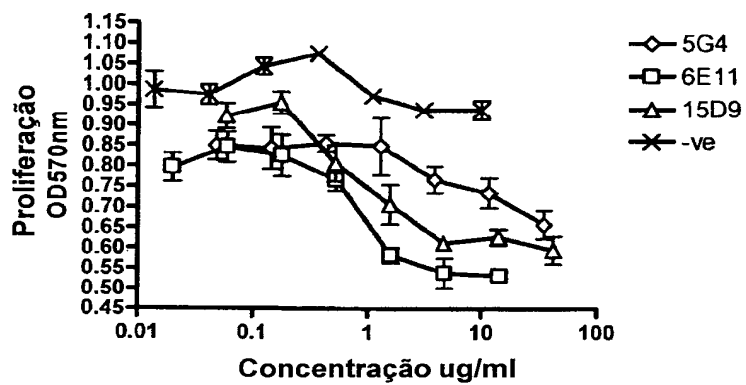


FIG. 24

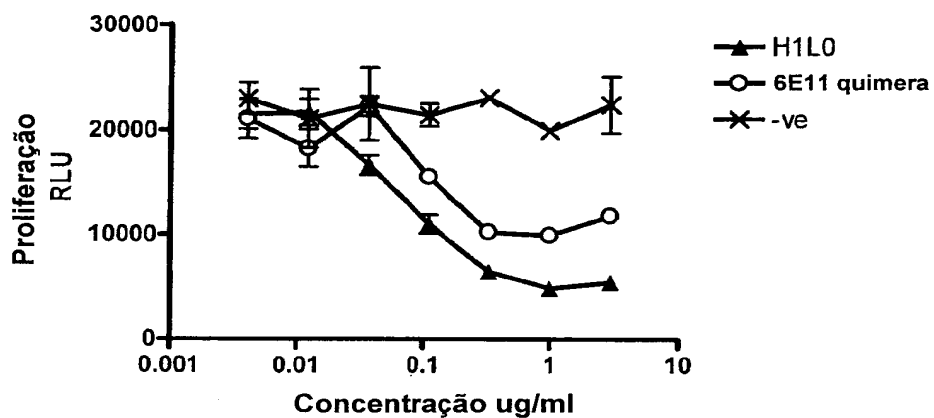


FIG. 25A

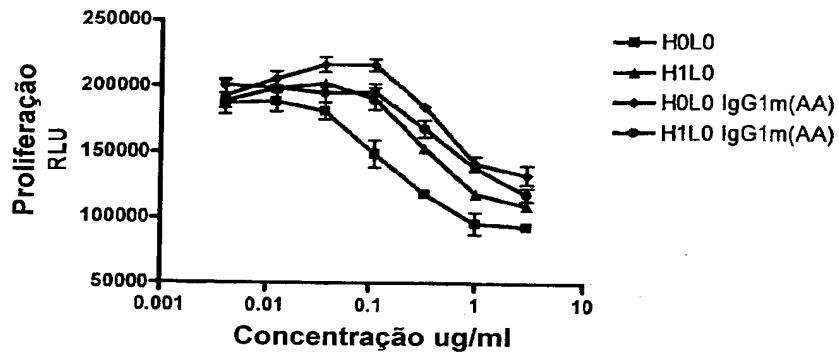


FIG. 25B

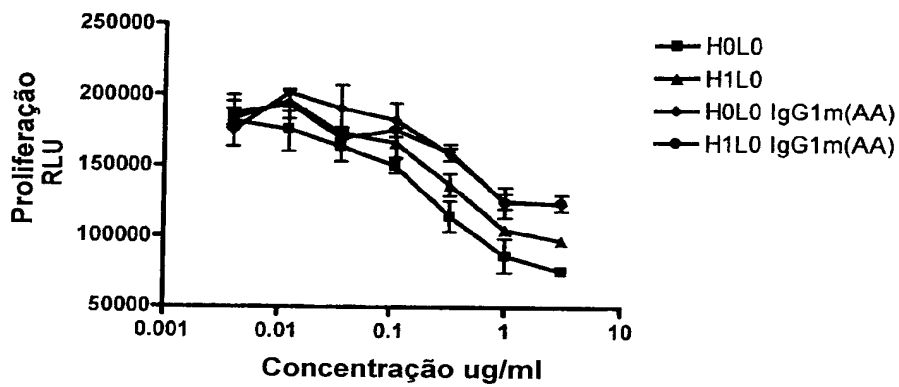


FIG. 25C

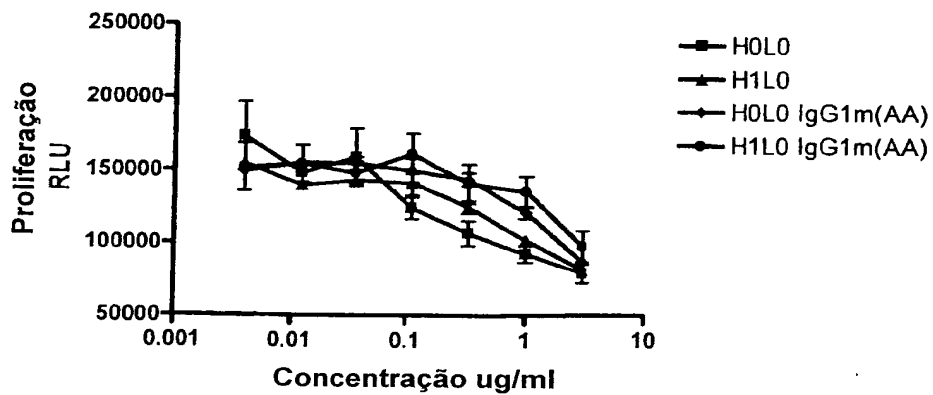


FIG. 25D

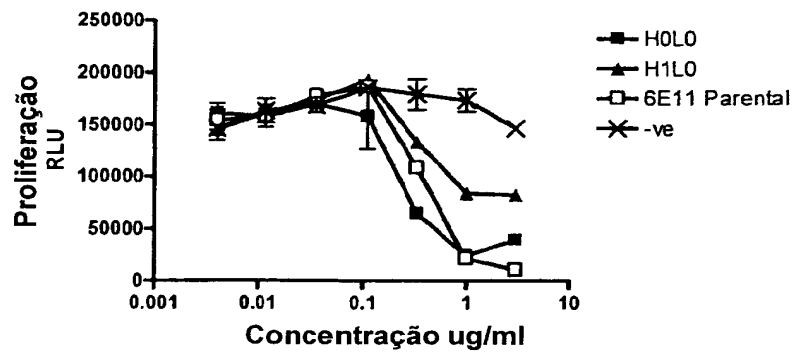


FIG. 25E

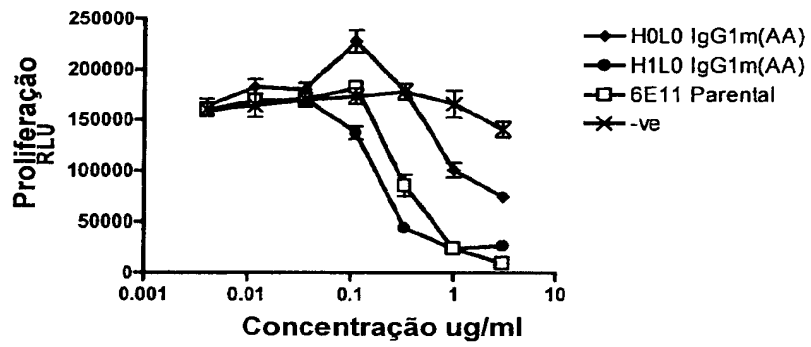


FIG. 26

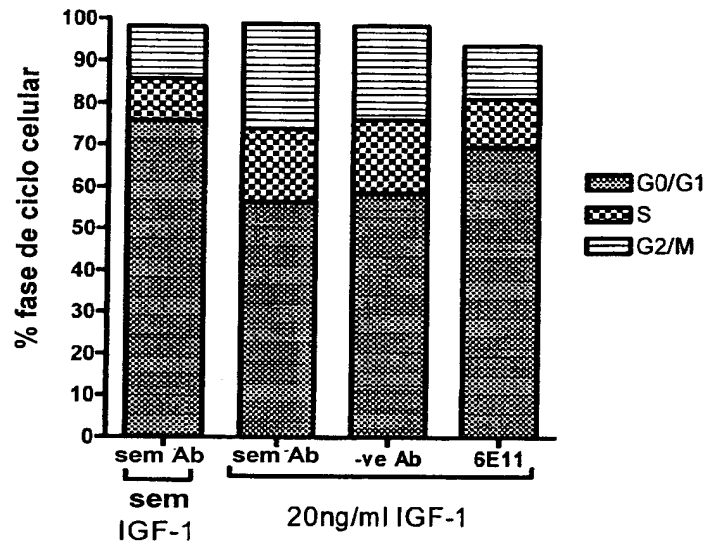


FIG. 27

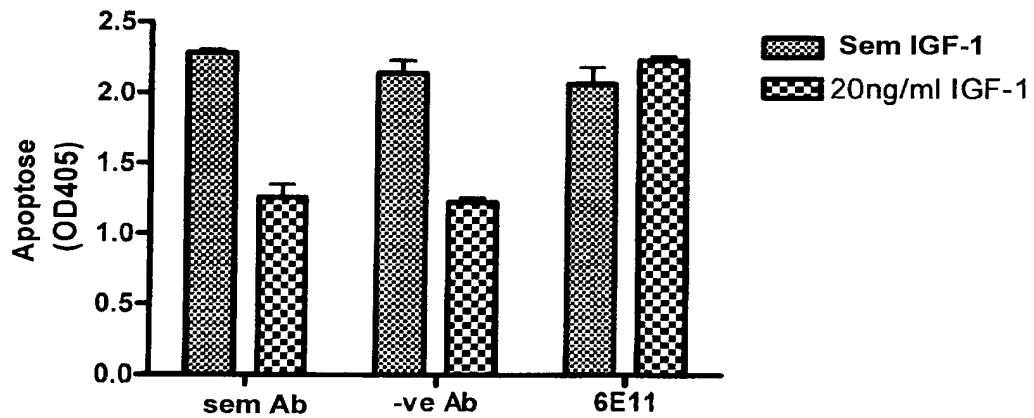


FIG. 28

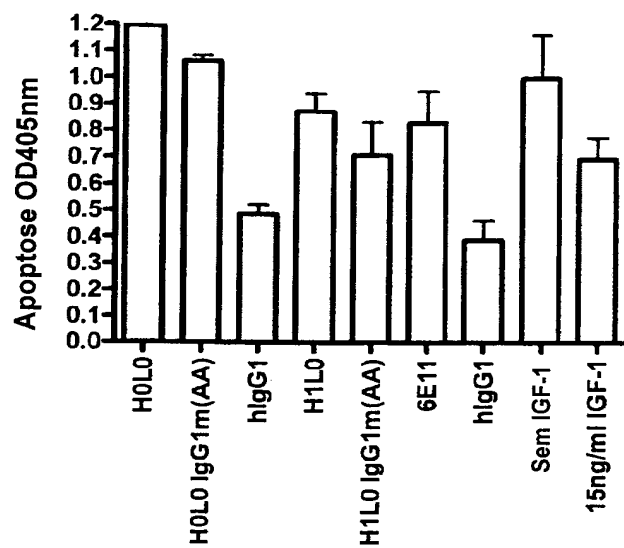


FIG. 29

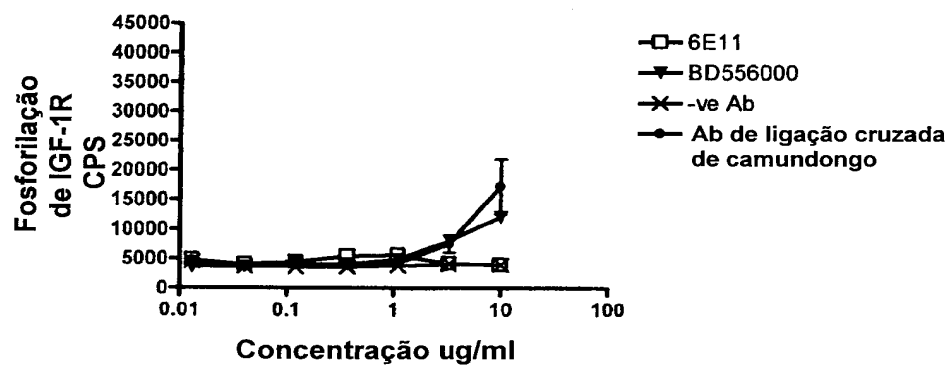


FIG. 30

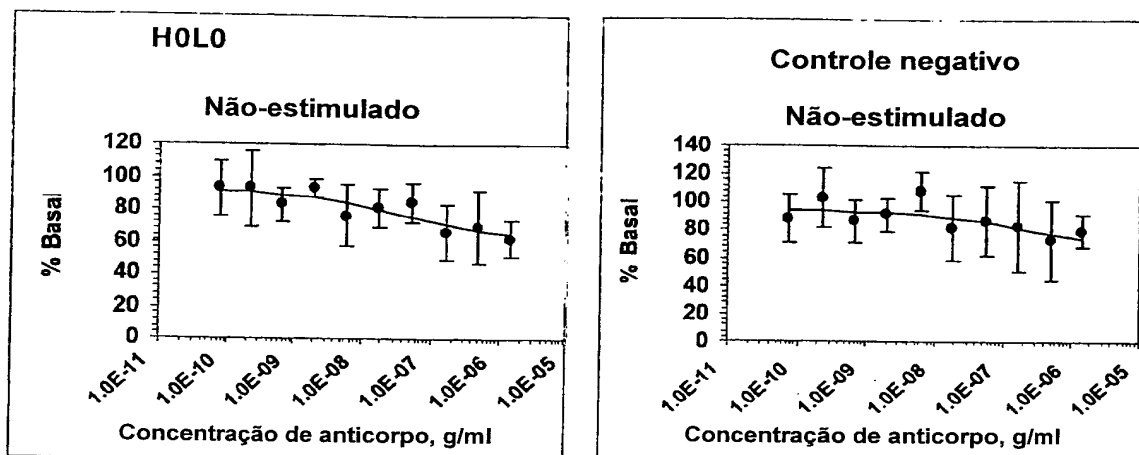


FIG. 31

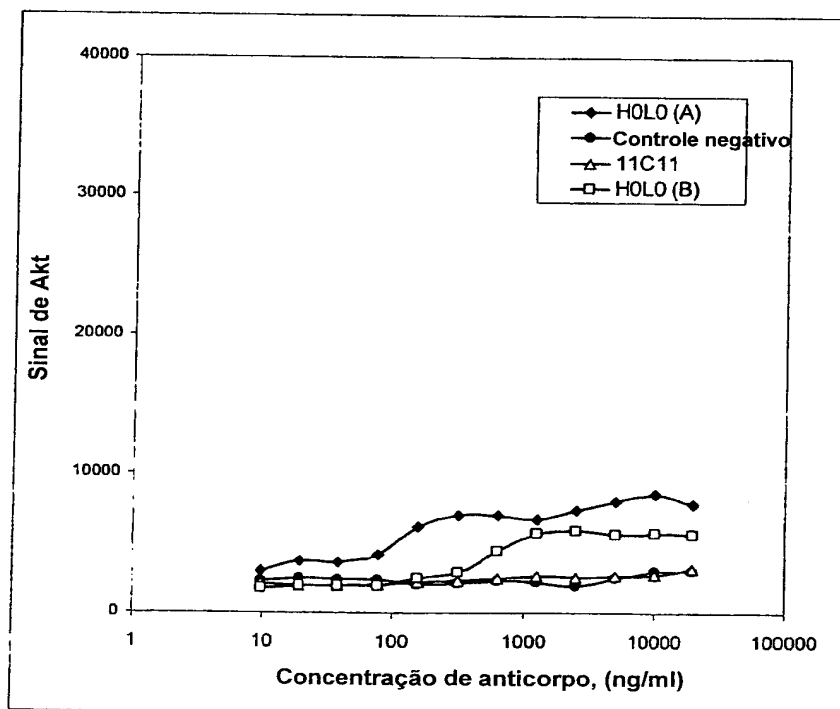


FIG. 32

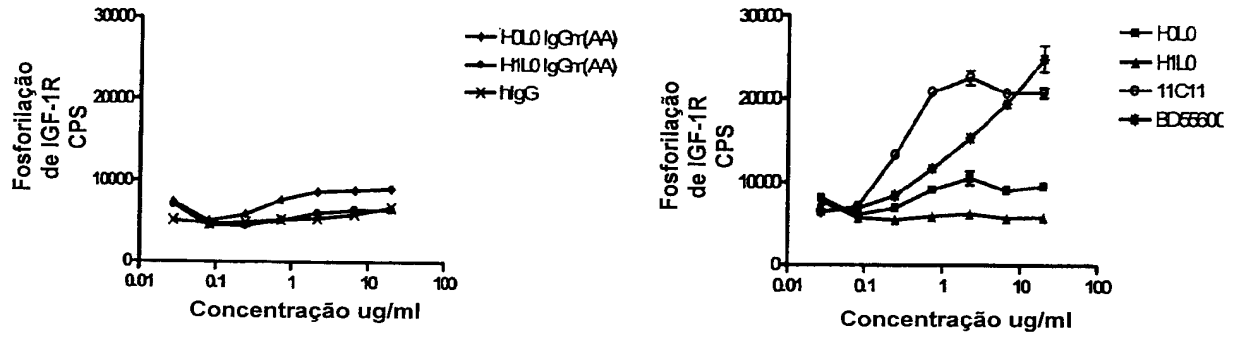


FIG. 33

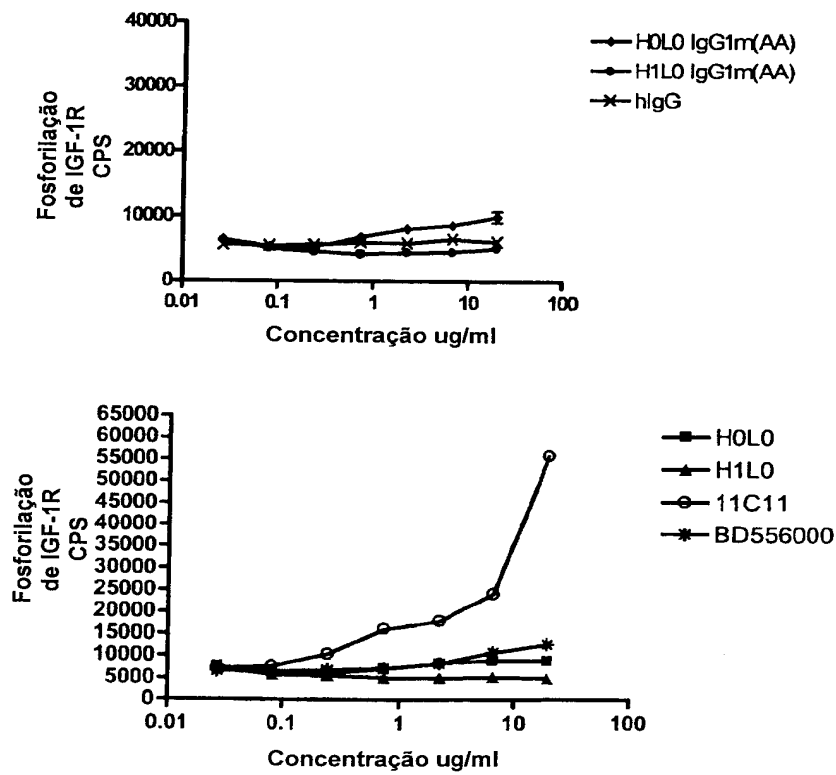


FIG. 34

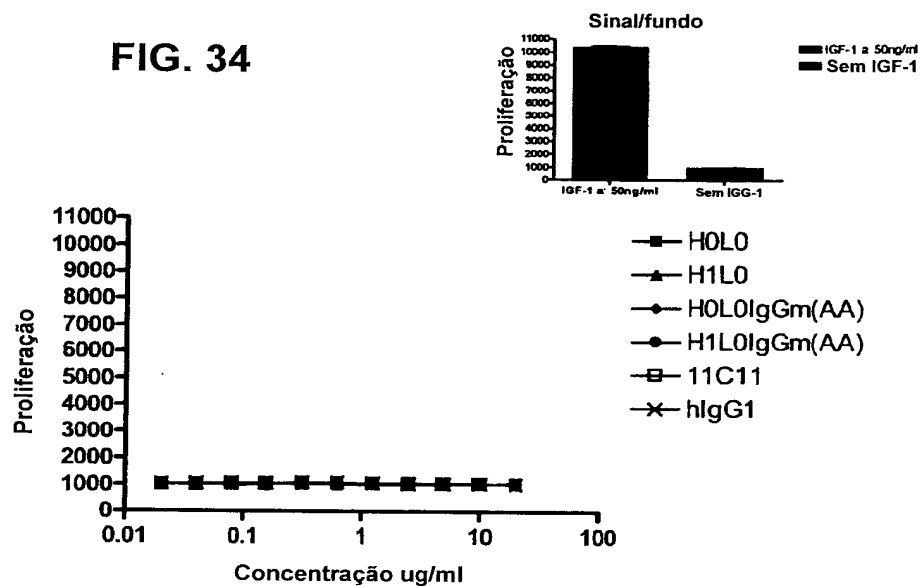


FIG. 35

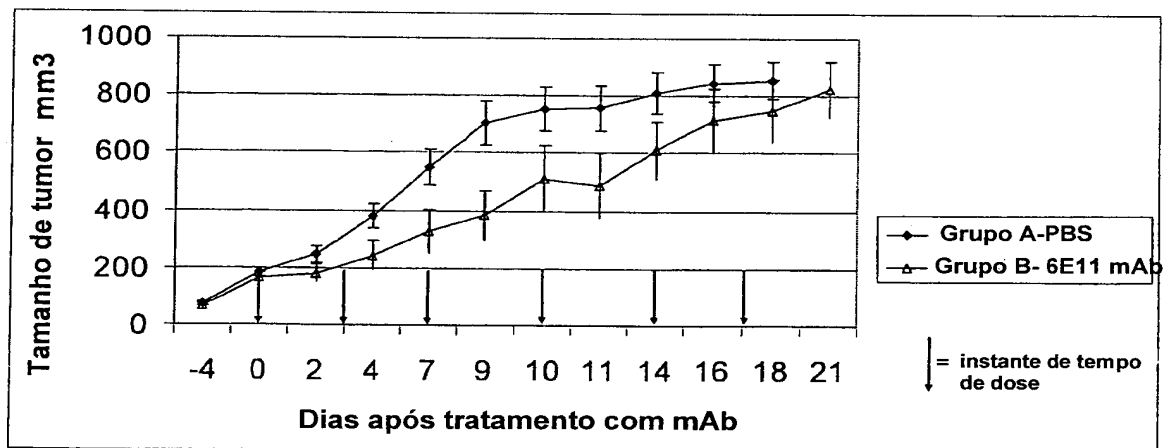


FIG. 36

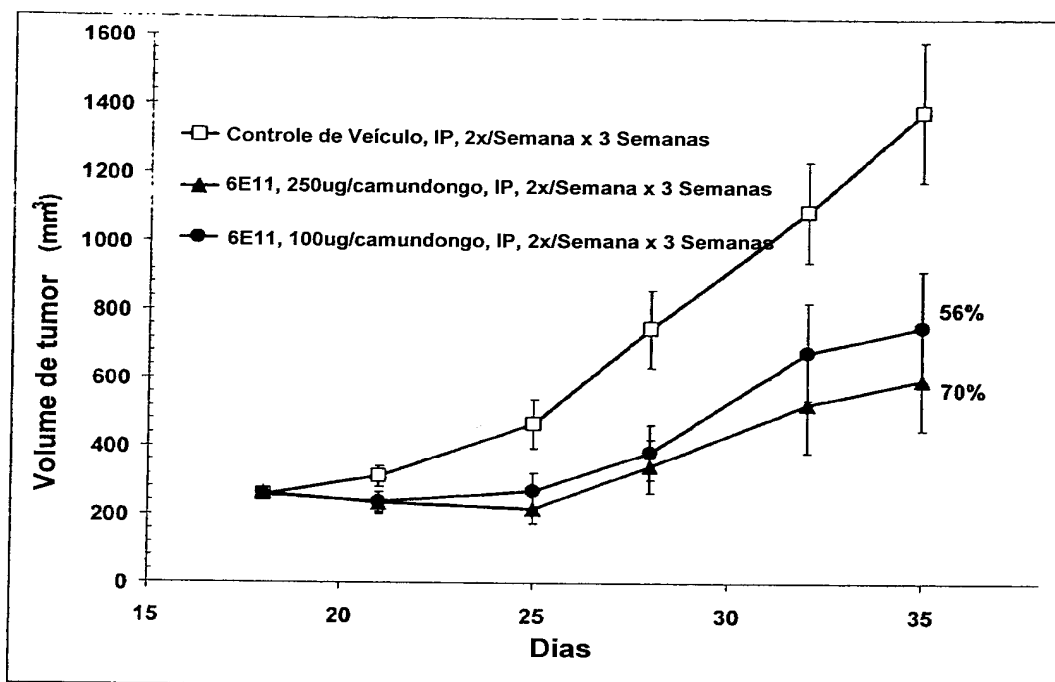


FIG. 37

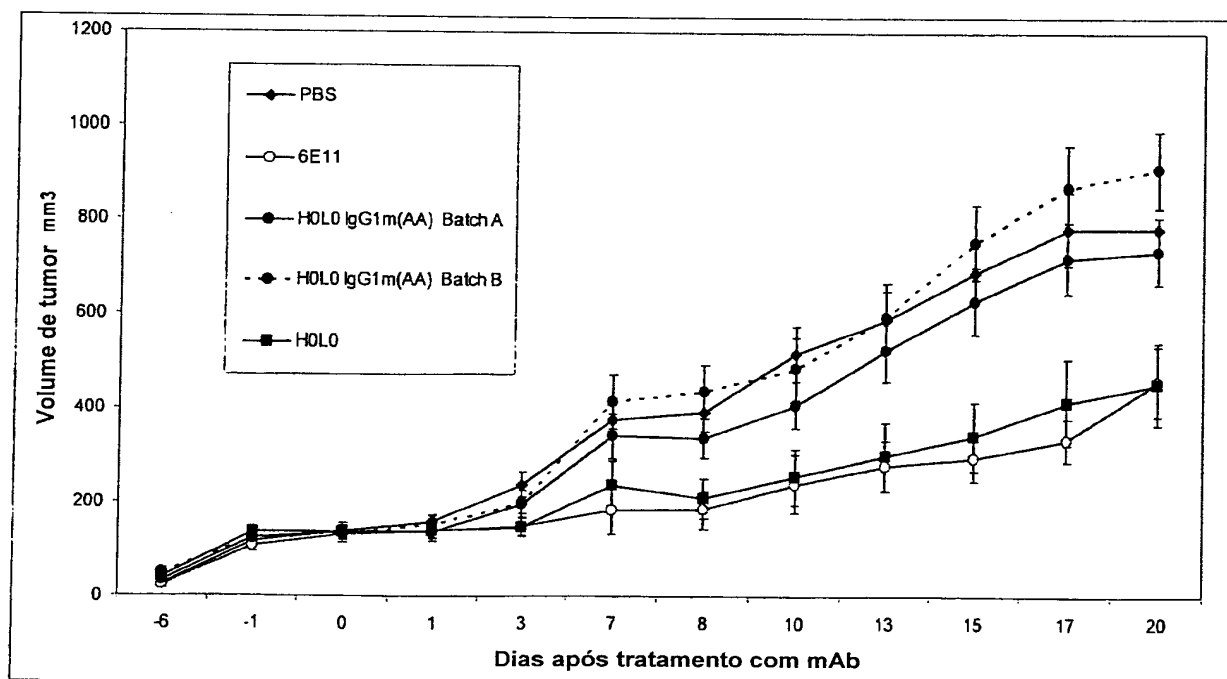


FIG. 38

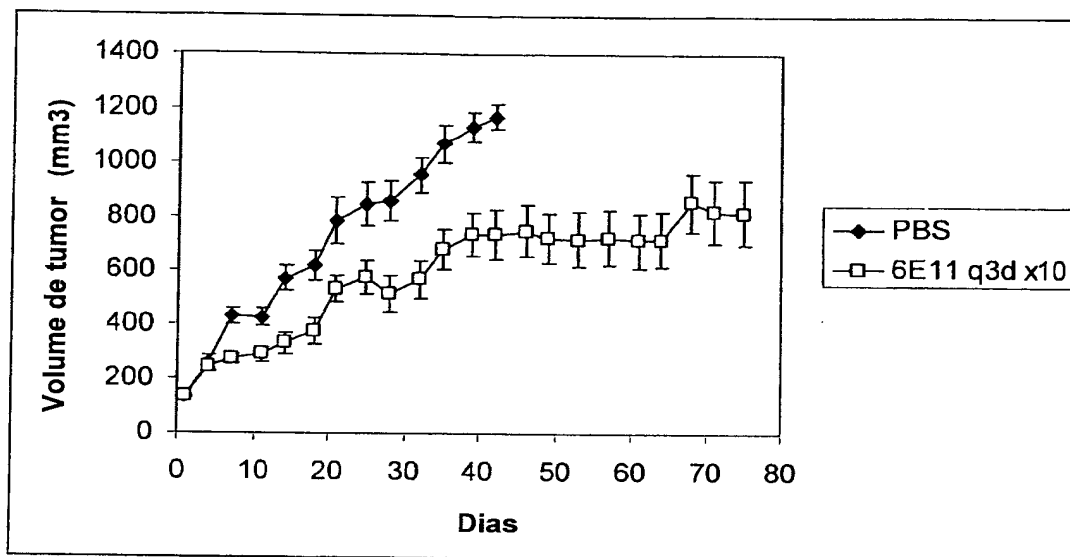


FIG. 39

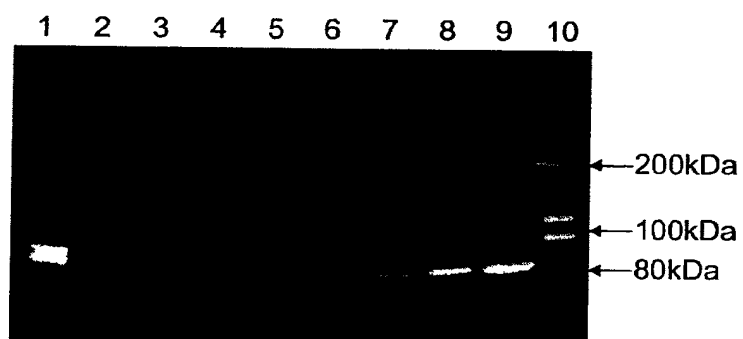


FIG. 40

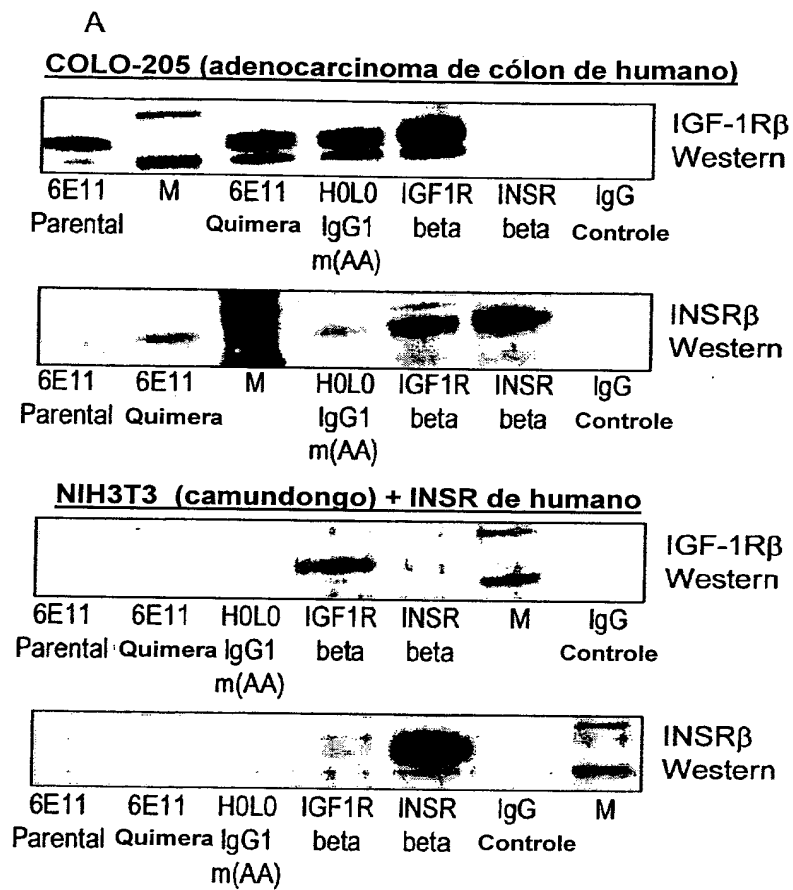
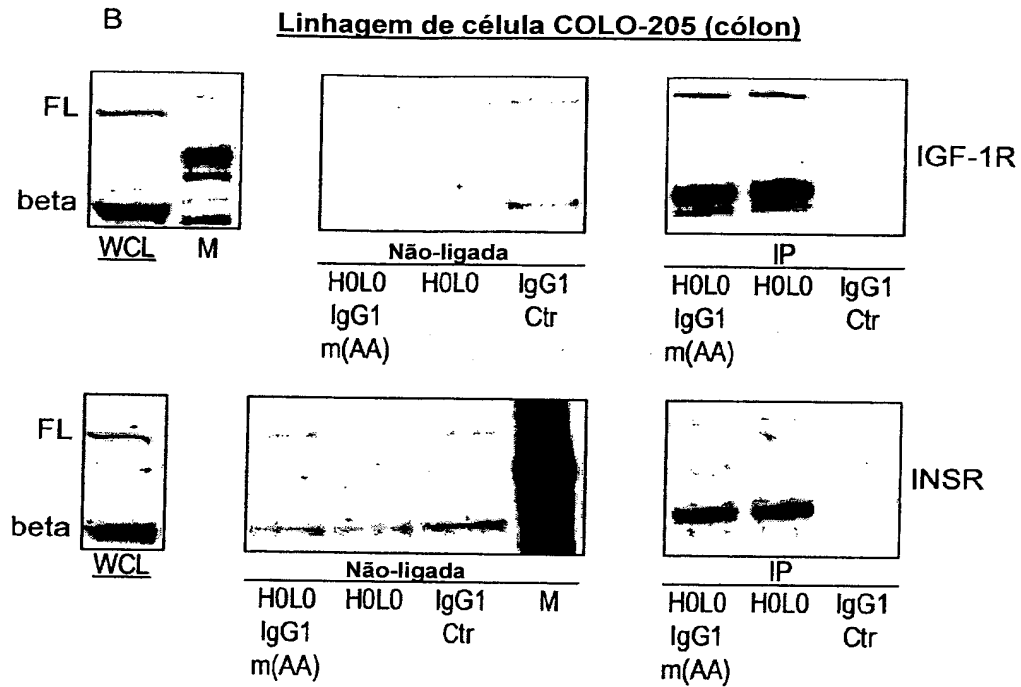


FIG. 40 CONT.



Chave:

WCL = lisado de célula inteiro

(Não-ligada) = Fração IP Não-ligada

M = Marcador Mwt

IP = Imunoprecipitação

FIG. 41

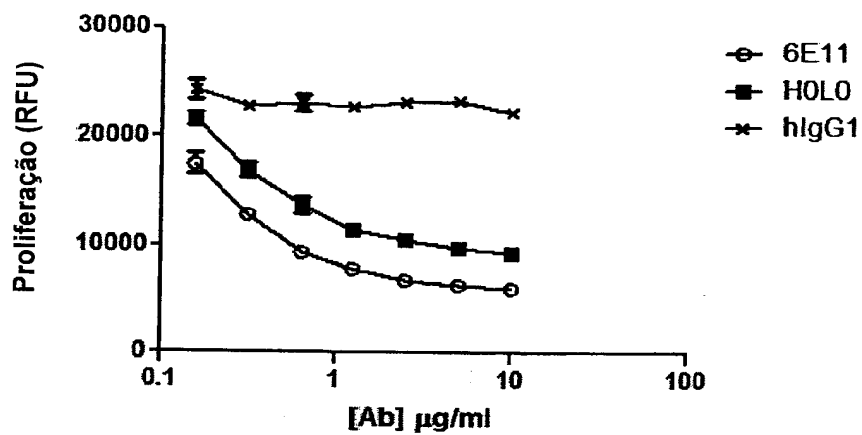


FIG. 42

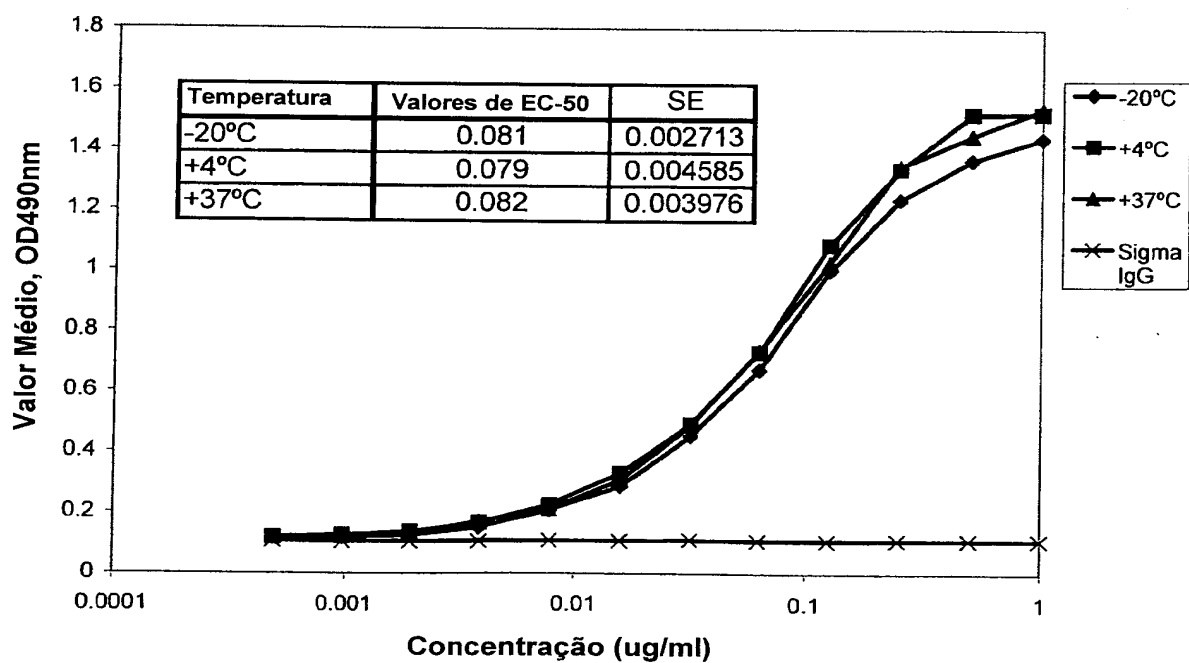
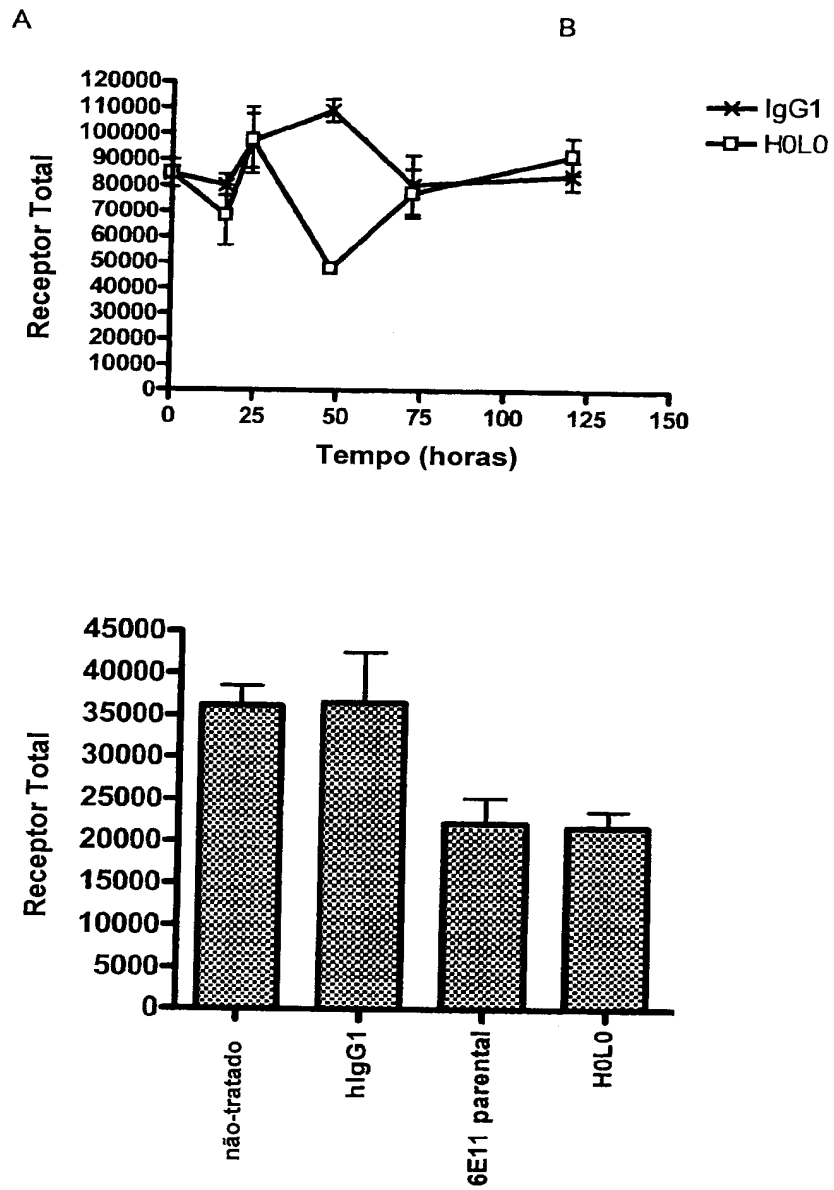


FIG. 43



RESUMO

“ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE TRANSFORMADA, TRANSFECTADA OU TRANSDUZIDA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPO OU DE FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT-DE-PARTES, E, USO DE ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO”

A presente invenção refere-se aos anticorpos ou aos fragmentos de ligante de antígeno dos mesmos que especificamente se ligam em IGF-1R, especialmente hIGF-1R. Também são reveladas preparações de anticorpo compreendendo anticorpos ou fragmentos de ligante de antígeno. Métodos de produção de tais anticorpos ou fragmentos de ligante de antígeno e usos dos mesmos também estão incluídos dentro do escopo da presente invenção.