



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.

15 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.

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-acetyl-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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 quimera 6E11 (6E11c).

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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*.

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

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.

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 afigrido com câncer cujo método compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da preparação de anticorpo aqui 10 descrita.

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 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 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 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.

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 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 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 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.

Em ainda uma outra modalidade da invenção é fornecido um
5 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 acceptora 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 acceptora 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 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 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).

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 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 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.

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

15 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 aperfeiçoadas. Por exemplo, sendo que ele tem ADCC aperfeiçoadas ou CDC aperfeiçoadas ou sendo que ele tem ambas funções efetoras de ADCC e de CDC aperfeiçoadas. Exemplos de 20 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 25 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 5 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 10 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 15 (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 20 posições selecionadas de 239 e 332 e 330, por exemplo S239D e I332E e A330L.

20 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 25 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 fragmento de ligante de antígeno do mesmo compreendendo os domínios 10 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 5 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 10 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: 15 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 20 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 25 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 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 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 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 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 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 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

15 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

20 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 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 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 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 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 químérica 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 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 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 célula hospedeira recombinante transformada, transfecada 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 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 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 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 20 método para a produção 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 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 25 de produzir um anticorpo como aqui descrito compreendendo expressar em 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.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecida uma
5 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.

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

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um
método para tratar um paciente humano afigido com artrite reumatóide cujo
método compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente
15 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.

Em outra modalidade da presente invenção é fornecido um
método para tratar um paciente humano afigido com câncer cujo método
compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz
de anticorpo compreendendo uma região constante ou fragmento de ligante de
25 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 afigido com retinopatia diabética 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 afigido com degeneração macular 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 uma outra modalidade da presente invenção é fornecido um método para tratar um paciente humano afigido 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 ligado em uma região constante de acordo com a invenção aqui descrita e um veículo farmaceuticamente 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, Osteossarcorna/Câncer Ósseo Histiocitoma Fibroso Maligno, Tumores 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, 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 Colón, 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, Neoplasia de Célula 15 Plasmática/Mieloma Múltiplo, Micose Fungóide, Síndromes Mieloplásticas, Doenças Mieloproliferativas/Mielodisplásicas, 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 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, Neoplasia 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 afigido 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 multiespecíficos (e.g. anticorpos biespecíficos), e fragmentos de anticorpo 20 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 • 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 • é o símbolo para o operador de multiplicação, e sendo

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

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 seqüência de nucleotídeos do outro polinucleotídeo de referência. Mudanças na seqüência de nucleotídeos da variante podem ou não alterar a seqüência 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 seqüência de referência, como discutido abaixo. Uma variante típica de um polipeptídeo difere em seqüência de aminoácidos do outro polipeptídeo de referência. Geralmente, diferenças são limitadas de modo que as seqüências 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 seqüência 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
Hidrofilica 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 5 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 10 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 15 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.

20 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.

25 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.

15 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”, “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 anticorpo aceptor.

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 anticorpo aceptor 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 anticorpo aceptor 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 anticorpo aceptor se originem do mesmo anticorpo aceptor. 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 aceptor” 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 aceptor.

“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 Fc γ RIII em células Matadoras Naturais ou via Fc γ RI 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 Natura. 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.

Vários 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 Fc γ presentes sobre a superfície de células imunes. Em humanos estes incluem Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII

(CD16). Interação entre o anticorpo ligado em antígeno e a formação do complexo Fc/Fcy 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 da 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 seqüência de aminoácidos da região constante. Dependendo da seqüência 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 efetoras 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 Trimera™ (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 Babcock et ai, 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 deconvulado, de diluição limitada e seleção e o Xenomouse II™ (Abgenix Inc). Uma abordagem 15 alternativa está disponível na Morphotek Inc usando a tecnologia Morphodoma™.

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 filamentoso 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 5 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 10 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 epitopo” também estão disponíveis, veja WO 93/06213. Veja também Waterhouse; Nucl.Acids Res 21, 2265-2266 (1993).

15 1.2 Anticorpos químéricos 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 20 sob administração múltipla do anticorpo de não-humano a um paciente humano. Vários 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 25 primeira é de os anticorpos químéricos, 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 aceptor”) e regiões constantes (veja Jones et al. (1986) Nature 321, 522-525 e Verhoeven 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 aceptor 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 5 “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 “*veeneering*” (modificação 10 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 15 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 20 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 25 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-transfetados 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 hIGF-1R, e dito anticorpo neutraliza a atividade de hIGF-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 hIGF-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

5 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

10 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,

15 que impede uma avidez 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

20 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

25 “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 ligante peptídeo, veja Kurucz et al. (1995) J. Immol,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.Can 77,763-772. A estabilidade 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 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) 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 uma orientação prevenindo pareamento intramolecular (diacorpo 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 engenhoado ligante de antígeno como descrito supra que especificamente se liga em hIGF-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 (Fc γ R) 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 Fc γ de humano correntemente reconhecidos, Fc γ R (I), Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa 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 Fc γ Rs, enquanto que Fc γ RII e Fc γ RIII utilizam

sítios distintos fora deste conjunto comum. Um grupo de resíduos de IgG1 reduziu a ligação em todos Fc γ Rs 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 Fc γ RI utilize apenas o conjunto comum de resíduos de IgG1 para ligação, Fc γ RII e Fc γ RIII interagem com resíduos distintos em adição ao conjunto comum. Alteração de alguns resíduos reduziu ligação apenas em Fc γ RII (e.g. Arg-292) ou Fc γ RIII (e.g. Glu-293). Algumas variantes mostraram ligação aperfeiçoada em Fc γ RII ou Fc γ RIII mas não afetaram a ligação no outro receptor (e.g. Ser-267Ala aperfeiçoou a ligação em Fc γ RII mas ligação em Fc γ RIII não foi afetada). Outras variantes exibiram ligação aperfeiçoada em Fc γ RII ou Fc γ RIII com redução em ligação no outro receptor (e.g. Ser-298Ala aperfeiçoou ligação em Fc γ RIII e reduziu ligação em Fc γ RII). Para Fc γ RIIIa, 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 ambas 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 interagem 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 5 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 regalactosilação e/ou ressialilação usando beta-1,4-galactosiltransferase e/ou alfa-2,3-sialiltransferase. Acredita-se que o aumento 10 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 15 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 20 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 25 polímero não-proteíntico 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 20 bem conhecida por aquelas pessoas experientes na técnica. Um 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 Biologics), 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 transfecção 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 15 genes sintéticos, que codificam a mesma proteína como um gene de tipo 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 transfecção com o gene de códon-otimizado em comparação com o nível quando transfecção 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 5 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 10 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 15 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 20 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 2μ e várias origens virais tais como SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV para a maioria das células de mamífero. Geralmente o componente origem de 25 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 5 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 10 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 Biologics). Um gene de seleção adequado para uso em levedura é o gene trpl, veja Stinchcomb et al. *Nature* 282, 38, 1979.

15 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 20 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. 25 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 polioma, epitelioma 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 Síntio 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. Seqüências 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

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), *Penicilllin*, *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 15 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 20 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 microssuportes 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 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 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 hidróxi-apatita (HA), cromatografia de afinidade (opcionalmente envolvendo um sistema de etiquetação 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 por outras etapas de cromatografia tais como cromatografia HA e/ou de troca iônica, cromatografia de troca aniónica 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 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-hepático, Câncer de Bexiga, Osteossarcorna/Câncer Ósseo Histocitoma Fibroso Maligno, Tumores 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, 10 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, 15 Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Colón, 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 20 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 25

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., Linfooblástica Aguda, Mielóide Aguda, Linfoцитica 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/Mielodisplásicas, 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 25 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 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 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 15 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 20 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 25 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.

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-metabólicos, 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, cisplatin, doxorubicin, topotecan, ciclofosfamida, melfalan, dacarbazine, daunorubicin, aminocamptotecin, etoposide, teniposide, adriamicin, 5-Fluorouracil, citosina arabinosídeo (Ara-C), Tiotepa, Taxotere, Buslfan, Citoxin, Txaol, Metotrexato, Vimblastine,

Bleomicin, Ifosfamide, Mitomicin C, Mitoxantrone, Vincreistine, Vinorelbine, Carboplatin, Carminomicin, Aminopterin, Dactinomicin, 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, Osteossarcorna/Câncer Ósseo Histiocitoma 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 Colônia, 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, 5 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, 10 Doenças Mieloproliferativas/Mielodisplásicas, Leucemia Mielógena, Leucemia Mielóide Crônica, Linfoma Múltiplo, Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Sino Paranasal e Cavidade Nasal, Câncer Nasofaríngeo, Neuroblastoma, Câncer Oral, Câncer Orofaríngeo Osteossarcorna/Histiocitoma Fibroso Maligno de Osso, Câncer Ovariano, 15 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 20 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, 25

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 5 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 10 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 15 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 20 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, cisplatin, doxorubicin, topotecan, 25 ciclofosfamida, melfalan, dacarbazine, daunorubicin, aminocamptotecin, etoposide, teniposide, adriamicin, 5-Fluorouracil, citosina arabinosídeo (Ara-C), Tiotepa, Taxotere, Buslfan, Citoxin, Txaol, Metotrexato, Vimblastine, Bleomicin, Ifosfamide, Mitomicin C, Mitoxantrone, Vincreistine, Vinorelbine, Carboplatin, Carminomicin, Aminopterin, Dactinomicin.

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: Leucemia Linfoblástica Aguda, Carcinoma Adrenocortical, Cânceres Relacionados com AIDS, Linfoma Relacionado com AIDS, Câncer Anal, Astrocytoma Cerebelar da Infância, Astrocytoma Cerebral da Infância, Câncer 5 Colorretal, Carcinoma de Célula Basal, Câncer de Duto Biliar Extra-hepático, Câncer de Bexiga, Osteossarcroma/Câncer Ósseo Histiocitoma Fibroso Maligno, Tumores Cerebrais (e.g., Glioma de Tronco Cerebral, Astrocytoma Cerebelar, Astrocytoma Cerebral/Glioma Maligno, Ependimoma, Meduloblastoma, Tumores Neuroectodermais Primitivos Supratentoriais, 10 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, Astrocytoma Cerebelar, Astrocytoma Cerebral/Glioma Maligno, Câncer Cervical, Cânceres 15 da Infância, Leucemia Linfocítica Crônica, Leucemia Mielógena Crônica, Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Colôn, 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 20 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, 25 Glioma (e.g., Adulto, Tronco Cerebral da Infância, Astrocytoma 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, 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, Doenças Mieloproliferativas/Mielodisplásicas, Leucemia Mielógena, Leucemia Mielóide Crônica, Linfoma Múltiplo, Distúrbios Mieloproliferativos Crônicos, Câncer de Sino Paranasal e Cavidade Nasal, Câncer Nasofaríngeo, Neuroblastoma, Câncer Oral, Câncer Orofaríngeo Osteossarcorna/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 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 5 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 10 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 farmaceuticamente aceitável da mesma 15 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

20 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 25 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 seqüência 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 seqüência 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 seqüência 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 seqüências de vetor T7 próximas da extremidade 5' da seqüência codificadora de IGF-1R. O cDNA obtido é 99,6% idêntico a uma seqüência de humano em nível de proteína (diferenças de 4aa em relação à seqüência humana). A seqüência 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 seqüência codificadora de SEQ ID NO 53 é idêntica à seqüência 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 seqüência 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

15 pFastBac 1 (Invitrogen) foi digerido com SnaBI e HpaI para remover o promotor de poliedrina. Este foi ligado com um fragmento NruI-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 20 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 biotinilação 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 transformadas 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, glutationa oxidada 1mM, glutationa 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 15 espectrometria de massa. As seqüências de ligante IGF-I etiquetado e ligante 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 (#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-transfetados 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 5 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

10 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).

15 20 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).

25 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/LISN 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 50 μ g 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 #610-15-732-124. 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 5 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 10 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 15 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.

20 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- 25 2 dias em DMEM completo (modificação DMEM-Hepes + 10%FCS). Anticorpos anti-hIGF-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 2 μ g/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 1 μ g/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).

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

Anticorpo	IC_{50} de estimulação por IGF-I (μ g/ml)	IC_{50} de estimulação por IGF-II (μ g/ml)
H0L0	0,06069	0,08145
H1L0	0,08359	0,10546
H0L0 IgG1m(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, a atividade dos anticorpos contra o receptor de insulina foi testada usando uma linhagem de célula 3T3 engenhada para expressar o receptor de insulina de humano. Neste experimento, nenhum dos anticorpos mostraram inibição de fosforilação de receptor induzida por insulina.

Tabela 2a Valores de IC_{50} para anticorpos selecionados 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.

Anticorpo	IGF-IR DELFIA - IC_{50} (nM)		IR DELFIA - IC_{50} (nM)	
	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

Placas de ELISA foram revestidas com um anticorpo antagonístico anti-IGF-1R de humano (MAB391, R&D Systems) a 2 μ 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 12-30 μ g/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 quimera (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 quimera (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 1-2 μ g/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 μ g/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 10 μ g/ml. Dados dispostos para 5 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 10 anticorpos humanizados em receptor de insulina recombinante em concentrações de até 50 μ g/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 BiacoreTM. 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 15 copulação de amina primária de acordo com os protocolos padrão de BiacoreTM, 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 20 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 25 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 5 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 10 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.

15 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	Ka	Kd	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

20 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	Ka	Kd	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 10 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 15 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) mostraram afinidade de ligação alta (-300-600pM) em IGF-1R recombinante de humano e de macaco cinomolgo e cinética comparável com 20 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
IgG1m(AA)						

Tem sido realizado um experimento que confirma que H0L0,

5 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

10 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

15 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

20 Biacore 3000.

25

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 (5 μ M) + 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 biosensor de estrepavidina 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 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-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).
- 15
- 20

Tabela 11 - Neutralização da ligação de receptor em ligante

Amostra	Neutralização % de ligação de receptor em IGF-I	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)

5 Células Colo205 (2×10^7 células/ml) foram coradas com anticorpos purificados anti MGF-1R a $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 10 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.

15 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 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ por 45mins a 4°C . Ligação foi detectada com anticorpo anti-IgG de humano conjugado com PE (Sigma P8047). Amostras foram analisadas por 20 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).

25 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. Apesar da 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 100 μ g/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. Apesar da 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); Cólono (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, confirmado 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 μ l de Gelatina 2% em PBS e incubadas em uma incubadora a 37°C por 5 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 10 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 (100 μ l = 15.000 células por cavidade) usando um Multidrop384 ou instrumento similar. As células foram incubadas durante a noite a 37°C em uma atmosfera 15 de 5% de CO₂, umidade de 90%. No dia seguinte, o meio foi removido, 200 μ l 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 μ l de Meio de 20 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 25 com 200 μ l de PBS. 75 μ l 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 μ l 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 20 μ L 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.

10 65 μ l de tampão de Lise Completo (tampão de Lise MSD 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 μ l 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 μ l/cavidade de 1x Tampão de lavagem MSD Tris. 50 μ l/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 μ l por cavidade usando 1x tampão de lavagem MSD (ELx405).

25 μ l 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 μ l 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.

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 pIC₅₀ (= -log₁₀(IC₅₀) em g/ml)

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 pIC₅₀ médios onde pIC₅₀ = -log₁₀(IC₅₀) 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 5 6E11 (Tabela 14).

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

Anticorpo	Experimento 1			Experimento 2				
	Média (g/ml)	pIC ₅₀ +/- DP	Média (g/ml)	V _{max}	Média (g/ml)	pIC ₅₀ +/- DP	Média (g/ml)	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 IgG1m(AA)	7,24 (0,14)		116 (11,0)		7,53(0,15)**		(7,9)	
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 10 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 15 (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 20 2 dias em meio completo (MEM+saís 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 - 10 μ g/ml) diluídas em meio livre de soro (100 μ l/cavidade). As células foram incubadas por 1 hora antes da adição ulterior de IGF-I (R&D Systems #291-5 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, 15 μ l de solução de corante MTT (Promega #G402A) foram adicionados em cada cavidade e as placas foram incubadas por mais 4 horas. 100 μ l 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.

10

Figura 23 mostra a atividade de vários anticorpos monoclonais de camundongo purificados para inibir a proliferação de células de tumor. 15 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 20 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 -3 μ g/ml de concentração final) de anticorpos purificados diluídos em meio livre de soro (50 μ l/cavidade). As 25 células foram incubadas por 1 hora antes da adição ulterior de 50 μ l/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, 100 μ l 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.

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 RPMI livre de soro) e incubadas em 1 mL de mesmo meio por 4 horas. O meio foi aspirado das células e 500 μ l de SFM contendo 20 μ g/ml de anticorpos purificados foram adicionados (concentração final 10 μ g/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 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 μ l 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 Etanol 80% gelado e incubação sobre gelo por 30min. As células foram pelotizadas e ressuspensas em 200 μ l de Iodeto de Propídio 50 μ g/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 100 μ l de meio RPMI completo e crescidas por 2 dias. As células foram então lavadas em SFM (RPMI sem soro) e incubadas em 100 μ l 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-hIGF-1R a 20 μ g/ml. As células foram adicionalmente tratadas com quer SFM sozinho, SFM + IGF-1 a 20ng/ml, SFM + Camptotecina a 5 μ M quer SFM + Camptotecina a 5 μ M + IGF-1 a 20ng/ml. Todos os tratamentos foram testados três vezes em um volume final de 100 μ l. A placa 15 foi então incubada por 20 horas. O meio foi aspirado das cavidades e as células foram lisadas pela adição de 200 μ l de NP-40 0,5% em PBS seguido por incubação de 5 min com agitação na temperatura ambiente. 20 μ l de lisado foram transferidos para uma microplaca preparada do kit Roche Cell Death 20 ELISA e 80 μ l de tampão de incubação foram adicionados. O protocolo 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 μ g/ml de anticorpos selecionados em condições livre de soro por 1 hora. IGF-1 a

15ng/ml e Camptotecina a 5 μ g/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 5 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 10 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 15 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 20 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 1 (Roche 11.697.498.001). A placa foi 25 deixada a -20°C durante a noite. Após descongelamento amostras de 100 μ l de lisado foram transferidas para uma placa ELISA de 96 cavidades pré-revestida com um anticorpo de captura anti IGF-1R (2B9) a 2 μ g/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 μ l 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 10 μ g/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 20 μ g/ml, não houve aumento em fosforilação de AKT 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 0-20 μ g/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

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 -20 μ g/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 10 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 atípicos. 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 atípicos de 4-6 semanas de idade. Uma vez tendo os tumores alcançado tamanho de 20 aproximadamente 150mm^3 , 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 25 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 250 μ g/camundongo e 100 μ g/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 100 μ g/camundongo e 250 μ g/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 atípicos 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 250 μ g 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 retardar 10 o 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 $80-120\text{mm}^3$ (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).

10 Um experimento similar àquele descrito acima foi realizado 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).

15 Um experimento similar àquele descrito acima também foi realizado usando camundongos implantados com 1x10⁷ 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).

20 Embora os dados destes dois últimos experimentos pareçam 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, consequentemente 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 5 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 10 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.

15 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 20 mostrados).

25 Em uma análise de pós-estudo, amostras de tumor colhidas no final de todos os três foram avaliadas para expressão de receptor por imuno-histoquímica. 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 1,67 μ g/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 a 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 (posta 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 5 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 10 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).

15 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 20 células/cavidade. Diluições dos anticorpos selecionados foram adicionadas dentro da faixa de 20-0,019 μ 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 25 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 μ 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 5 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 atípicos foram implantados com $2,5 \times 10^6$ células 3T3/LISN em matrigel (Becton Dickinson). Quando os tumores 15 alcançaram um tamanho de $400-500 \text{mm}^3$, 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 20 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 25 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 $400-500 \text{mm}^3$ os camundongos foram dosados duas vezes 72 horas

separadamente com 250 μ g de quer anticorpo de controle quer H0L0 24 horas após a dose final, 10 μ g 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, 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 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

100 μ l de lisado de tumores contendo 10 ou 25 μ g 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. 100 μ l de anticorpo policlonal biotinilado anti-IGF-1R (R&D Systems BAF391) a 400ng/ml em 4%BSA/TBS foram adicionados em cada cavidade e incubados por 1 hora na temperatura ambiente. Placas foram lavadas em TBST e 100 μ l 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 100 μ l de solução 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 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 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 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 Químérica compreendendo seqüências de *mus musculus* e *homo sapiens*

<400> 12

<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

<210> 14

<210> 14

<212> PBT

<212> HK1

<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 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 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> Seqüência 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 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 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 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
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
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
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

gagggtccagc	tgcaacaatc	tggacctgag	ctggtaaagc	ctggggcttc	agtgaggata	60
tcctgttaagg	cttctggata	cgcgttcaact	gactactaca	tgaactgggt	gaagcagagc	120
catggaaaga	gccttgagtg	ggtggcaaat	attaatccca	acaatggtgg	tactaactac	180
aaccagaagt	tcaaggacaa	ggccacattt	actgttagaca	agtccctccaa	cacagcctac	240
atggagctcc	gcagtctgac	atctgaggac	actgcagtt	attactgtgc	aagatggatt	300
ctttactacg	gtcgttagcaa	atggtaatcc	gatgtctggg	gcacaggac	cacggtcacc	360
gtctccctcg						369

<210> 27

<211> 342

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<400> 27

gatgttttga	tgacccaaac	tccactctcc	ctgcctgtca	gtcttgaga	tcacgcctcc	60
atctcttgca	gatcttagtca	gagtattgtt	caaagtaatg	gagacaccta	tttagaatgg	120
tacctgcaga	aaccaggcca	gtctccaaag	ctcctgatct	acagaatttc	caaccgattt	180
tctggggtcc	cagacaggtt	cagtggcagt	ggatcagggaa	cagatttcac	actcaagatc	240
agtagaagtgg	aggctgagga	tctggagtt	tattactgtc	ttcagggttc	acatgttccg	300
tacacgttccg	gaggggggac	caagctggaa	ataaaacggg	ct		342

<210> 28

<211> 369

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<400> 28

gagggtccagc	tgcaacaatc	tggacctgag	ctggtaaagc	ctggggcttc	agtgaggata	60
tcctgttaagg	cttctggata	cgcgttcaact	gactactaca	tgaactgggt	gaaacagagc	120
catggaaaga	gccttgagtg	gatggcaaat	attaatccca	acaatggtgg	tactaactac	180
aaccagaagt	tcaaggacaa	ggccacattt	actgttagaca	agtccctccaa	cacagcctac	240
atggagctcc	gcagtctgac	atctgaggac	tctgcagtt	attactgtgc	aagatggatt	300
ctttactacg	gtcgttagcaa	gtggtaatcc	gatgtctggg	gcacaggac	cacggtcacc	360
gtctccctcg						369

<210> 29

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

<400> 29
 gatgtttga tgacccaaag tccactctcc ctgcctgtca gtctggaga tcacgcctcc 60
 atctcttgca gatctagtcg gagcattgtt caaagtaatg gagacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct atagagttc caaccgattt 180
 tctgggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcagggc cagatttcac actcaagatc 240
 agtagagtg 29
 aggctgagga tctggagtt tattactgtt 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 ctggtaagc ctggggcttc agtgaggata 60
 tcctgttaagg cttctggata cgcgttcaact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg ggtggcaat attaatccca acaatggtgg tactaactac 180
 aaccagaagt tcaaggacaa gccacattt actgttagaca agtcctccaa cacagcctac 240
 atggagctcc gcagtctgac atctgaggac actgcagttt attactgtgc aagatggatt 300
 ctttactacg gtcgttagcaa atggtaacttc gatgtctggg gcacaggac 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
 gatgtttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtctggaga tcacgcctcc 60
 atctcttgca gatctagtcg gagtattgtt caaagtaatg gagacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acagaatttc caaccgattt 180
 tctgggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcagggc cagatttcac actcaagatc 240
 agtagagtg 31
 aggctgagga tctggagtt tattactgtt ttcagggttc acatgttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgtt 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 tttcttcctc ctgtcagaaa ctgcagggtt cctctctgag 60
 gtccagctgc aacaatctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaggatatcc 120
 tctaaggctt ctggatacgc gttcaactgac tactacatga actgggtgaa gcagagccat 180
 ggaaagagcc ttgagtgggt ggcaaatatt aatcccaaca atgggtgtac taactacaac 240
 cagaagtca aggacaaggc cacattgact gtagacaagt cctccaacac agcctacatg 300

gagctccgca gtctgacatc tgaggacact gcagtcatt actgtgcaag atggatttt 360
 tactacggc gtagcaaatg gtacttcgt gtctgggca cagggacact agtcacagtc 420
 tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cacccctc caagagcacc 480
 tctggggca cagcggcct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
 gtgtcggtga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgcctacag 600
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cttggcacc 660
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgaa caagaaagtt 720
 gagcccaaat ttgtgacaa aactcacaca tgcccacccgt gcccagcacc tgaactcctg 780
 gggggaccgt cagtcttccctt cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctccgg 840
 acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900
 aactgttacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaga caaagcccg gggaggagcag 960
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgaccaggaa ctggctgaat 1020
 ggcaggagt acaagtgcac ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1080
 atctccaaag ccaaaggcga gccccgagaa ccacagggtgt acaccctgcc cccatccgg 1140
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccgac 1200
 gacatcggccg tggagtggg gagaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260
 cccgtgctgg actccgcacgg ctcccttccctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320
 aggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg gttaaatga 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

atgaagggtgc ctgttcggcgt cgtgggtgtg atgttctggaa ttccctgtttc cagcagtgat 60
 gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca cgcctccatc 120
 tcttgcagat ctatgcagaa tattttcaaa agtaatggag acacattttt agaatggtag 180
 ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgtatctaca gaatttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccaag acaggttcag tggcagtggaa tcaggacag atttcacact caagatca 300
 agagtgaggc ctgaggatct gggagttat tactgtttc agggttcaca tggctccatc 360
 acgttccggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggctgcacc atctgtttc 420
 atcttcccgcc catctgtatga gcagttgaaa tctggaaactg cctctgttgc tgcctgtc 480
 aataacttct atccccagaga ggc当地aaatgtt cagttggaaagg tggacaacgc cctccaaatcg 540
 ggttaactccc aggagaggtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaacacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagttca acagggaga gtgttag 717

<210> 34

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

caggtccagc tgggtcagag cggcgacag gtgaagaagc ccggagctag cgtcaaggc 60
 tcctgcaagg cttcaggctt cacatttacc gactactaca tgaactgggt gagacaggct 120
 ccaggacagg gcctcgatgt gatgggcaac atcaacccca acaatggcg gacaaactac 180
 aaccagaagt tcaaggatcg cgtgaccatg accaccgaca ctgcacccctc aacagcctac 240
 atggagctga ggtctctgcgt gaggatgc actgccgtgt actactgtgc caggtggatt 300
 ctgtactacg ggaggagcaa gtggacttc gacgtctggg gaagaggac actagtgacc 360
 gtgagcagc 369

<210> 35

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

caggtccagc tgggcagag cggcgcagag gtgcagaagg ccggagctag cgtcaagg 60
 tcctgcaagg cttcaggcta cgccttcacc gactactaca tgaactgggt gagacaggct 120
 ccaggacagg gcctcgatg gatggcaac atcaacccca acaatggcg gacaaactac 180
 aaccagaagt tcaaggatcg cgtgaccatg accaccgaca ctagcaccc aacagctac 240
 atggagctga ggtctctgcg gagcgatgac actgccgtgt actactgtgc caggtggatt 300
 ctgtactacg ggaggagcaa gtggacttc gacgtctggg gaagagggac actagtgacc 360
 gtgagcagc 369

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

<400> 36

gacatcgtca tgacccagag cccactgtca ctccccgtga caccggaga gcccgttagc 60
 atcagctgta gaagctcca gagcatcgatg cagtctaacc gcgataccta cctcgagtgg 120
 tacctgcaga agcccgaca gtctcctcag ctcctgattt accgcgttag caatcgctt 180
 tccgggtgc ctgatcggtt tagcgctca ggaagcgaa ccgacttcac cctgaagatc 240
 tcaagggtgg aggctgagga tggggcgtg tactactgtc tccaggatc 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 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
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
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> 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
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	215	220
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

atgggatggc cctgtatcat cctgtttctg gtggccacag caactggcgt gcactctcag 60
 gtccagctgg tgcagagcgg cgccaggggtg aagaagcccg gagctagcgt caaggctc 120
 tgcaaggctt caggctacac attcaccgac tactacatga actgggtgag acaggctcca 180
 ggacagggcc tcgagtggt gggcaacatc aaccccaaca atggcgggac aaactacaac 240
 cagaagttca aggatcgcgt gaccatgacc accgacacta gcaccta 300
 gagctgaggt ctctgcggag cgatgacact gccgtgtact actgtgccc 360
 tactacggga ggagcaagt gtacttcgac gtctgggaa gagggacact agtgaccgtg 420
 tccagcgcca gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccc 480
 agcggccggca cagccgcctt gggctgcctg gtgaaggact acttccccc 540
 gtgtccttgc acagcgggac ccccaac 600
 agcagcggcc tggatggat gtgaccgtgc ccaggcagc 660
 cagacatca tctgttaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtg 720
 gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgccccc 780
 ggaggccccc gcgtgttctt gttccccc 840
 aactgggtac tggatggat ggaggtgcac aatgccaaga ccaagccc 900
 tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgt ctgaccgtgc tgcaccagg 960
 ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccac aaggccctgc ctgcccctat 1020
 atcagcaagg ccaaggccca gcccagagag ccccaaggtgt acaccctgc 1080
 atcagcaagg ccaaggccca gcccagagag ccccaaggtgt acaccctgc 1140
 gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctt tgaaggc 1200
 gacatcggcc tggatggat gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacccc 1260
 cctgtgttgc acagcgttgc ctttttttgc ttttttttgc acgtgaccgt 1320
 agatggcggc agggcaacgt gttcaatgtgc tccgtatgc acgaggccct 1380
 tacaccaga agaggcttgc cctgtccctt ggcaagtga 1419

<210> 41

<211> 1419

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

atgggatggc cctgtatcat cctgtttctg gtggccacag caactggcgt gcactctcag 60
 gtccagctgg tgcagagcgg cgccaggggtg aagaagcccg gagctagcgt caaggctc 120
 tgcaaggctt caggctacac attcaccgac tactacatga actgggtgag acaggctcca 180
 ggacagggcc tcgagtggt gggcaacatc aaccccaaca atggcgggac aaactacaac 240
 cagaagttca aggatcgcgt gaccatgacc accgacacta gcaccta 300
 gagctgaggt ctctgcggag cgatgacact gccgtgtact actgtgccc 360
 tactacggga ggagcaagt gtacttcgac gtctgggaa gagggacact agtgaccgtg 420
 tccagcgcca gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccc 480
 agcggccggca cagccgcctt gggctgcctg gtgaaggact acttccccc 540
 gtgtccttgc acagcgggac cctgaccgtgc ggcgtgcaca ccccaac 600
 agcagcggcc tggatggat gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacccc 660
 cagacatca tctgttaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtg 720
 gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgccccc 780
 ggaggccccc gcgtgttctt gttccccc 840
 aactgggtac tggatggat ggaggtgcac aatgccaaga ccaagccc 900
 tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgt ctgaccgtgc tgcaccagg 960
 ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccac aaggccctgc ctgcccctat 1020
 atcagcaagg ccaaggccca gcccagagag ccccaaggtgt acaccctgc 1080
 gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctt tgaaggc 1140
 gacatcggcc tggatggat gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacccc 1260

cctgtgtctgg acagcgatgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1320
agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc tcctgtatgc acgaggccct gcacaatcac 1380
tacaccccaga agagcctgag cctgtccccct ggcaagtga 1419

<210> 42

<211> 717

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

atgggatgg	cctgcatcat	cctgttcctg	gtggcaactg	ccactggagt	ccactccgac	60
atcgcatga	cccgagccc	actgtcactc	cccgtgacac	ccggagagcc	cgctagcatc	120
agctgtagaa	gctcccagag	catcgtgcag	tctaaccggcg	ataccctacct	cgagtggta	180
ctgcagaagc	ccggacagtc	tcctcagtc	ctgatttacc	gcgtcagcaa	tcgcgtttcc	240
gggggtgcctg	atcggtttag	cggctcagga	agcggaaaccg	acttcaccct	gaagatctca	300
agggtggagg	ctgaggatgt	gggcgtgtac	tactgttcc	agggatctca	cgtgccttac	360
accttcggac	agggcacaaa	gctcgagatt	aagcgtacgg	tggccgcccc	cagcgtgttc	420
atcttccccc	ccagcgtatga	gcagctgaag	agcggcaccc	ccagcgtggt	gtgtctgt	480
aacaacttct	acccccggga	ggccaagggt	cagtggaaagg	tggacaatgc	cctgcagagc	540
ggcaacagcc	aggagagcgt	gaccgagcag	gacagcaagg	actccaccta	cagcctgagc	600
agcaccctga	ccctgagcaa	ggccgactac	gagaaggcaca	aggtgtacgc	ctgtgagggt	660
acccaccagg	gcctgtccag	ccccgtgacc	aagagcttc	accggggcga	gtgctga	717

<210> 43

<211> 19

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Seqüência líder Campath

<400> 43

<210> 44

<211> 1367

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

```

Met Lys Ser Gly Ser 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	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	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					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 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 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 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							480
Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	His	Phe	Thr
485									490						495
Ser	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							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							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							720
Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro	Glu
								725							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
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		1360
	1365	

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

<400> 46		
Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu		
1	5	10
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
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 Ile 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	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
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 Trp Lys Asn Arg 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 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

805	810	815
Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala		
820	825	830
Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser		
835	840	845
Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu		
850	855	860
Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys		
865	870	875
Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg		
885	890	895
Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser		
900	905	910
Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys		
915	920	925
Thr Thr Tyr Glu Asn Phe Met His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala		
930	935	940
Ile Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His		
945	950	955
Arg Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser		
965	970	975
Val Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu		
980	985	990
Trp Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Asn Arg Glu Leu Gly Gln		
995	1000	1005
Gly Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys		
1010	1015	1020
Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala Ala		
1025	1030	1035
Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys		
1045	1050	1055
Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val Val Ser Gln		
1060	1065	1070
Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr Arg Gly Asp Leu		
1075	1080	1085
Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Val Glu Gln Asn Asn Leu		
1090	1095	1100
Val Leu Ile Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile Gln Met Ala Gly Glu		
1105	1110	1115
Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala Asn Lys Phe Val His Arg		
1125	1130	1135
Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys		
1140	1145	1150
Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr		
1155	1160	1165
Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu		
1170	1175	1180
Ser Leu Lys Asp Gly Val Phe Thr Thr His Ser Asp Val Trp Ser Phe		
1185	1190	1195
Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln		
1205	1210	1215
Gly Leu Ser Asn Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu		
1220	1225	1230
Leu Asp Lys Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg		
1235	1240	1245
Met Cys Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile		
1250	1255	1260
Ile Gly Ser Ile Lys Asp Glu Met Glu Pro Ser Phe Gln Glu Val Ser		
1265	1270	1275
Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Pro Pro Glu Pro Glu Leu Glu		
1285	1290	1295
Met Glu Leu Glu Met Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp		
1300	1305	1310

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	Ser	Pro	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Leu		
1								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	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	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					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	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro	Lys	
					690			695				700			
Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	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 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 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 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	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
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 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 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 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
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 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 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 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		320
325	330	335
Lys Val Cys His Leu Leu Glu Gly Glu Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr		
340	345	350
Ser Ala Gln Glu Leu Arg Gly Cys Thr Val Ile Asn Gly Ser Leu Ile		
355	360	365
Ile Asn Ile Arg Gly Gly Asn Asn Leu Ala Ala Glu Leu Glu Ala Asn		
370	375	380
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		400
405	410	415
Gly Glu Thr Leu Glu Ile Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Ala Leu Asp Asn		
420	425	430
Gln Asn Leu Arg Gln Leu Trp Asp Trp Ser Lys His Asn Leu Thr Ile		
435	440	445
Thr Gln Gly Lys Leu Phe Phe His Tyr Asn Pro Lys Leu Cys Leu Ser		
450	455	460
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	495
Asn Glu Leu Leu Lys Phe Ser Tyr Ile Arg Thr Ser Phe Asp Lys Ile		
500	505	510
Leu Leu Arg Trp Glu Pro Tyr Trp Pro Pro Asp Phe Arg Asp Leu Leu		
515	520	525
Gly Phe Met Leu Phe Tyr Lys Glu Ala Pro Tyr Gln Asn Val Thr Glu		
530	535	540
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	575
Gly Trp Leu Met Arg Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln Tyr Ala Ile Phe		
580	585	590
Val Lys Thr Leu Val Thr Phe Ser Asp Glu Arg Arg Thr Tyr Gly Ala		
595	600	605
Lys Ser Asp Ile Ile Tyr Val Gln Thr Asp Ala Thr Asn Pro Ser Val		
610	615	620
Pro Leu Asp Pro Ile Ser Val Ser Asn 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	655
Val Phe Trp Glu Arg Gln Ala Glu Asp Ser Glu Leu Phe Glu Leu Asp		
660	665	670
Tyr Cys Leu Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ser Arg Thr Trp Ser Pro Pro		
675	680	685
Phe Glu Ser Glu Asp Ser Gln Lys His Asn Gln Ser Glu Tyr Glu Asp		
690	695	700
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	735
His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Lys Thr Ser Ser Gly Thr Gly Ala		
740	745	750
Glu Asp Pro Arg Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ser Leu Gly Asp Val Gly		
755	760	765
Asn Val Thr Val Ala Val Pro Thr Val Ala Ala Phe Pro Asn Thr Ser		
770	775	780
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
Tyr Thr His Met Asn Gly Gly Lys Lys Asn Gly Arg Ile Leu Thr Leu		
1360	1365	1370
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
```

<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
 atgggatgtt cctgttatcat cctgtttctg gtggccacag caactggcgt gcactctcag 60
 gtccagctgg tgcagagcgg cgcagaggta aagaagcccg gagctagcgt caagggtctcc 120
 tgcaggctt caggctacgc cttcaccgac tactacatga actgggttag acaggctcca 180

```

ggacaggggcc tcgagtggtat gggcaacatc aaccccaaca atggcgggac aaactacaac 240
cagaaggttca aggatcgctg gaccatgacc accgacacta gcacccatcaac agcctatcg 300
gagctgaggt ctctcgccgg gcatgacact gccgtgtact actgtgccag gtggatttcg 360
tactacggga ggagcaagtg gtacttcgac gtctggggaa gagggacact agtgaccgtg 420
agcagcggccca gcaccaagggg ccccagcgtg ttccccctgg ccccccagcag caagagcacc 480
agcggccggca cagccgcctt gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtgacc 540
gtgtccttggaa acagcggagc cctgacaagg ggggtgcaca cttcccccgc cgtgctgcag 600
agcagcggccctt tgacagcct qagcagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaagggtg 720
gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacc tgccccccct gccctgcccc tgaactggcc 780
ggagccccctt ccgttgcctt gttccccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg 840
accccccggagg tgacctgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aggaccctga ggtgaagttc 900
aatttgttacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagccccg ggaggaacag 960
tacaacacgca cctaccgggtt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 1020
ggcaaagaat acaagtgcac ggtgtccaaac aaggccctgc ctgcccccat cgagaaaacc 1080
atcagcaagg ccaagggccca gcccaggggaa ccccaagggtt acaccctgac cccctccccc 1140
gacgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggtttt ctaccccaacg 1200
gacatcgcccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacccccc 1260
cctgtgtctgg acagcgtacgg cagttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1320
cggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgtatgc acgaggccct gcacaaccac 1380
tacacccaga agagccttagt cctgtcccccc ggcacgtga 1419

```

<210> 58

<211> 717

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

```

atgggatggc cctgcatcat cctgttcctg gtggcaactg ccactggagt ccactccgac 60
atcgcatga cccagagccc actgtcactc cccgtgacac ccggagagcc cgctagatc 120
agctgtagaa gctcccagag catcgtgcag tctaaccggg atacccatct cggatggatc 180
ctgcagaagc cccggacagtc tcctcagctc ctgatttacc gcgtcagcaa tcgttttcc 240
ggggtgctg atcggtttag cggctcagga agcggaaaccg acttcaccct gaagatctca 300
agggtggagg ctgaggatgt gggcgtgtac tactgcttcc agggatctca cgtgccttac 360
accttcggac agggcacaaa gctcgagatt aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 420
atcttccccc ccagcgtacga gcagctgaag agcggcacccg ccagcgttgt gtgcctgtg 480
aacaacttct acccccgggg ggcacgggt cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 540
ggcaacagcc aggaaagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 600
agcacccctga cactgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgagggt 660
acccaccagg gcctgtccag cccgtgacc aagagcttca accqqqqcga qtqctag 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
 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

```

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

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

<220>
<223> Xaa denota posições de CDR's na seqüência 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 Xaa		
20 25 30		
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 cgtcaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactactaca tgaactgggt gcggcaggcc 120
ccaggccagg gactggaatg gatggcaac atcaacccca acaacggcgg caccaactac 180
aaccagaagt tcaaggaccg ggtcaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgcccgtgt actactgcgc ccggtggtac 300
ctgtactacg gccggtccaa gtggtacttc gacgtgtggg gcaggggcac actagt 356
```

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

<400> 62

```
gacatcgta tgacccagag ccccctgagc ctgcccgtga cccctggcga gcccggccagc 60
atcagctgca gaagcagcca gagcatcgta cagagcaacg ggcacaccta cctggaatgg 120
tatctgcaga agcccgccca gtccccccag ctgctgatct acagagttag caaccgggtc 180
agcggcgtgc ccgacagatt cagcggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
agccgggtgg aggccgagga cgtggcggtg tactactgct ttcaaggcag ccacgtgccc 300
tacaccttcg gccaggcgcac caagctggaa atcaagcgta cg 342
```

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

<400> 63

```

actagtccacc  gtgagcagcg  ccagcaccaa  gggcccccagc  gtgttcccccc  tggccccccag  60
cagcaagagc  accagcggcg  gcacagccgc  cctgggtcgc  ctggtaagg  actacttccc  120
cgagccctgt  accgtgagct  ggaacagcgg  agccctgacc  tccggcgtgc  acaccttccc  180
cgccgtgctg  cagagcagcg  gcctgtacag  cctgagcagc  gtggtgaccg  tgcccaagcag  240
cagcctggc  acccagacct  acatctgcaa  cgtgaaccac  aagcccagca  acaccaaggt  300
ggacaagaag  gtggagccca  agagctgcga  caagacccac  acctgcccccc  cctgcctgc  360
ccctgagctg  ctgggccccac  ccgacgtgtt  cctgttcccccc  cccaaagccca  aggacacccct  420
gatgatcagc  cggacccccc  aggtgacctg  cgtggtggtg  gacgtgagcc  acgaggaccc  480
tgaggtgaag  ttcaatttgtt  acgtggacgg  cgtggaggtg  cacaacgcac  agaccaagcc  540
ccgggaggaa  cagtacaaca  gcacctaccc  ggtggtgtcc  gtgctgaccg  tgctgcacca  600
ggactggctg  aacggccaaag  aatacaagtg  caaggtgtcc  aacaaggccc  tgcctgcccc  660
cgaggaaaag  accatcagca  aggccaaagg  ccagccccagg  gaaccccccagg  tgtacacccct  720
gccccccctcc  cgggacgagc  tgaccaagaa  ccaggtgtcc  ctgacccgtc  tggtaagg  780
cttctacccc  agcgacatcg  ccgtggagtg  ggagagcaac  ggccagcccc  agaacaacta  840
caagaccacc  cccccctgtgc  tggacagcga  cggcagcttc  ttccctgtaca  gcaagctgac  900
cgtggacaag  agccgggtggc  agcagggcaa  cgtgttcagg  tgcagcgtga  tgcacgaggc  960
cctgcacaaac  cactacaccc  agaagagccct  gagectgtcc  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
 actagtaccc gtgaggcagcg ccagcaccaa gggcccccagc gtgttccccc tggcccccag 60
 cagcaagagc accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc 120
 cgagcccggt accgtgagct ggaacagcgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc 180
 cggccgtgctg cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtaaccg tgcccagcag 240
 cagcctgggc acccagaccc acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt 300
 ggacaagaag gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgcctgc 360
 ccctgagctg ctgggcccac ccgacgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccc 420
 gatgatcagc cggacccccc aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggaccc 480
 tgaggtgaag ttcaatttgtt acgtggacgg cgtggagggtg cacaacgcca agaccaagcc 540
 ccgggaggaa cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca 600
 ggactggctg aacggcaaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgcctctgcc 660
 cgaggaaaag accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gaaccccagg tgtacaccc 720
 gccccccctcc cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtaaggg 780
 cttcttacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta 840
 caagaccacc cccctgtgc tggacagcga cggcagctc ttcctgtaca gcaagctgac 900
 cgtggacaag agccgggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcacggtga 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

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	320
Leu His Asn His Tyr	Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro	Gly Lys
	325	330	335

<210> 67

<211> 1419

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 67

atgggcgtgt	cctgcatcat	cctgtttctg	gtggccaccc	ccaccggcgt	gcacagccag	60
gtgcagctgg	tgcagagcgg	agccgaggtg	aagaagcctg	gcgcgcacgt	caaggtgtcc	120
tgcaaggcca	gcccgtacac	cttcaccgcac	tactacatga	actgggtgcg	gcaggcccc	180
ggccaggggac	tggaatggat	gggcaacatc	aaccccaaca	acggccgcac	caactacaac	240
cagaagttca	aggaccgggt	caccatgacc	accgacacca	gcaccagcac	cgcctacatg	300
gaactgcgga	gcctgagaag	cgacgacacc	gccgtgtact	actgcgccc	gtggatcctg	360
tactacggcc	ggtccaagtg	gtacttcgac	gtgtgggca	ggggcacact	agtaccgtg	420
agcagcgcac	gcaccaagg	ccccagcgt	ttccccctgg	cccccagcag	caagagcacc	480
agcggcggca	cagccgcct	gggctgcctg	gtgaaggact	acttccccga	gcccgtaacc	540
gtgagctgga	acagcggagc	cctgacccctc	ggcgtgcaca	cttcccccgc	cgtgctgcag	600
agcagcggcc	tgtacagcct	gagcagcgt	gtgaccgtgc	ccagcagcag	cctgggcacc	660
cagacctaca	tctgcaacgt	gaaccacaag	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagaagg	720
gagcccaaga	gctgcgacaa	gaccacaccc	tgccccccct	gccctgcccc	tgagctgctg	780
ggcggacccg	acgtgttcc	gttccccccc	aagcccaagg	acaccctgat	gatcagccgg	840
accccccagg	tgacctgcgt	ggtgtggac	gtgagccacg	aggaccctga	gttgaagttc	900
aatttgtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	aacgccaaga	ccaagccccc	ggaggaacag	960
tacaacacgca	cctaccgggt	ggtgtccgt	ctgaccgtgc	tgcaccagga	ctggctgaac	1020
ggcaaagaat	acaagtgcac	ggtgtccaaac	aaggccctgc	ctgcccccg	gaaaaagacc	1080
atcagcaagg	ccaaaggggcca	gcccaggaa	ccccaggtgt	acaccctgcc	cccctcccg	1140
gacgagctga	ccaaagaacca	ggtgtccctg	acctgtctgg	tgaaggcctt	ctaccccaac	1200
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaacggc	cagccccgaga	acaactacaa	gaccaccc	1260
cctgtgtctgg	acagcgcacgg	cagcttcttc	ctgtacagca	agctgaccgt	gacaagagc	1320
cggtggcagc	agggcaacgt	gttcagctgc	acggtgtatgc	acgaggccct	gcacaaccac	1380
tacaccacaga	agagccttag	cctgtccccc	ggcaagtgaa			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	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	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
165														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	
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
245														255	
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	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	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
325														335	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
340								345						350	
Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	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	
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
405														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> 69
<211> 717
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 69
atgggctgggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccc ccaccggcgt gcacagcgac 60
atcgatgtga cccagagccc cctgaggctg cccgtgaccc ctggcgagcc cgccagcatc 120
agctgcagaa gcagccagag catcgccag agcaacggcg acacctacct ggaatggat 180
ctgcagaagc ccggccagtc ccccccagctg ctgatctaca gagtgagcaa ccgggttcagc 240

ggcgtgccc acagattcag cggcagcggc tccggcaccg acttcaccct gaagatcagc 300
 cgggtggagg ccgaggacgt gggcgtgtac tactgcttc aaggcagcca cgtgcctac 360
 accttcggcc agggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggccgcccc cagcgtgttc 420
 atcttcccccc ccagcgatga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 480
 aacaacttct acccccgggg ggcacaagggtg cagtggaagg tggacaatgc cctgcagagc 540
 ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 600
 agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgagggtg 660
 acccaccagg gcctgtccag ccccggtgacc aagagttca accggggcga gtgctga 717

<210> 70

<211> 1422

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

atgggctggt cctgcacat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60
 gtgcagctgg tgcagagcgg agccgaggtg aagaagcctg gcgccagcgt caaggtgtcc 120
 tgcaaggcca gcggctacac cttcaccgac tactacatga actgggtgcg gcaggcccc 180
 ggccaggggac tggaaatggat gggcaacatc aaccccaaca acggcggcac caactacaac 240
 cagaagttca aggaccgggt caccatgacc accgacacca gcaccagcac cgcttacatg 300
 gaactgcgggaa gcctgagaag cgacgacacc gccgtgtact actgcgcggc gtggatctg 360
 tactacggcc ggtccaagtg gtacttcgac gtgtggggca gggcacact agtgaccgtg 420
 tccagcgcca gcaccaaggg ccccagcgtg ttcccccctgg ccccccagcag caagagcacc 480
 agcggcggca cagccgcct gggctgcctg gtgaaggact acttccccca accggtgacc 540
 gtgtctgga acagcgggagc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccccg cgtgctgcag 600
 agcagcggcc tgcacacgt gggcggcgt gtgaccgtgc ccagcagcag cctggcacc 660
 cagacccata tctgtaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg 720
 gagcccaaga gctgtgaccaa gaccacacc tgccccccct gccctgcccc cgagctgctg 780
 ggaggccccca gcgtgttcct gttccccccct aagcctaagg acaccctgtat gatcagcaga 840
 acccccgagg tgacctgtgt ggtgggtgat gtgagccacg aggaccctga ggtgaagttc 900
 aactggtacg tggacggcgt ggagggtgcac aatgccaaga ccaagcccg ggaggagcag 960
 tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac 1020
 ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaaac aaggccctgc ctgccccctat cgagaaaacc 1080
 atcagaagg ccaaggggcca gcccagagag ccccaggtgt acaccctgcc ccctagcaga 1140
 gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tgaagggtt ctaccccgac 1200
 gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccggaga acaactacaa gaccacccccc 1260
 cctgtgtccgg acagcgatgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1320
 agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc tccgtgtatgc acgaggccct gcacaatcac 1380
 tacaccaga agagcctgag cctgtccccct ggcaagtgtat 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 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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:

5 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

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.

5 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 químérico ou humanizado.

10- 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.

15 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.

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

25 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, 5 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 10 efetora por exemplo onde ele é capaz de alguma função de ADCC ou CDC.

24. Célula hospedeira recombinante transformada, transfetada ou transduzida, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos um cassete de expressão, por meio do qual dito cassete de expressão compreende 15 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, transfetada 20 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 25 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 afigido com câncer.

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

36. Uso de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o paciente está afigido 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 de pulmão ou mieloma.

10 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.

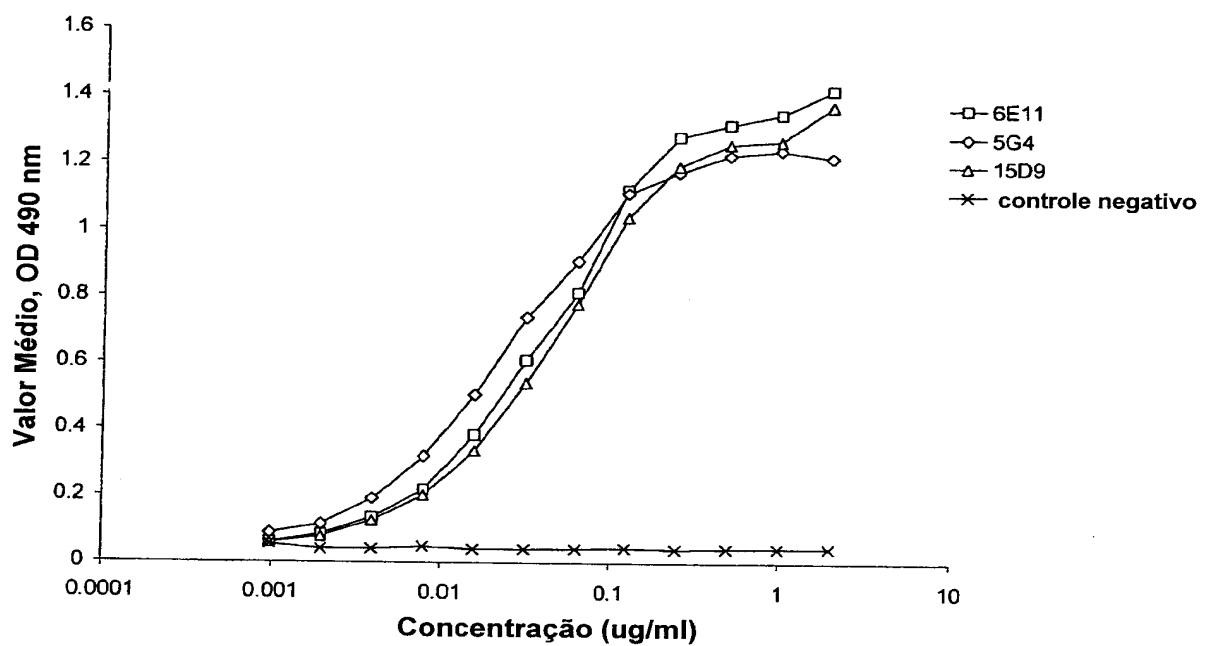
FIG. 1

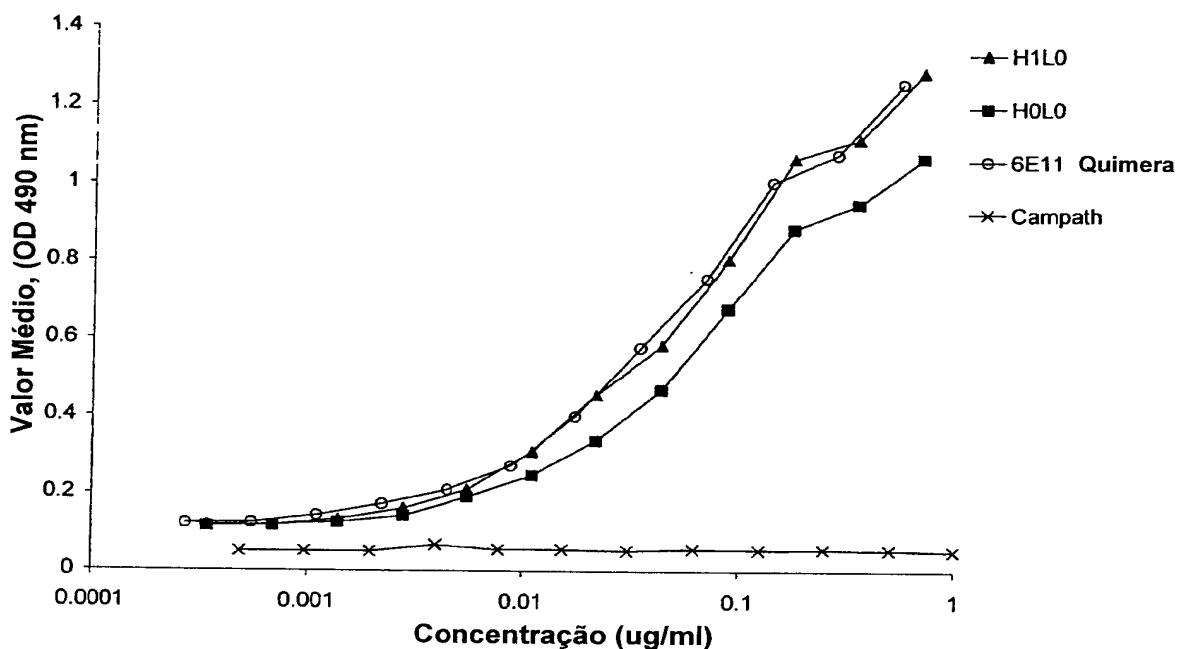
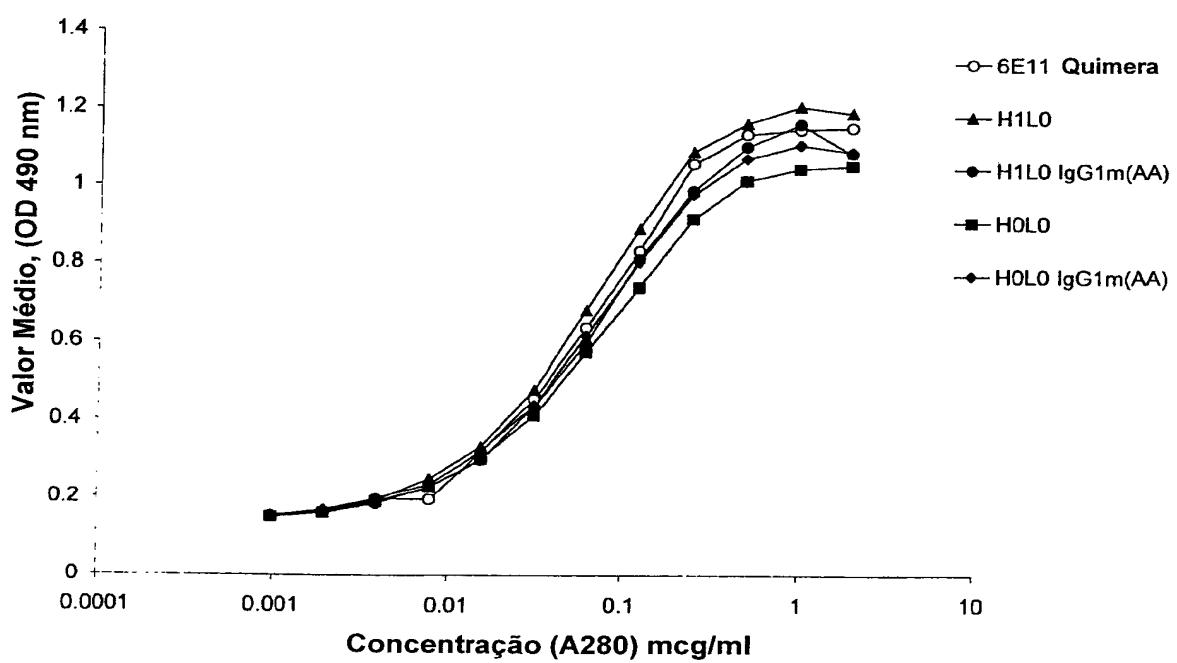
FIGURA 2**Figura 2A - ELISA de ligação - anticorpos purificados****Figura 2B - ELISA de ligação - anticorpos purificados**

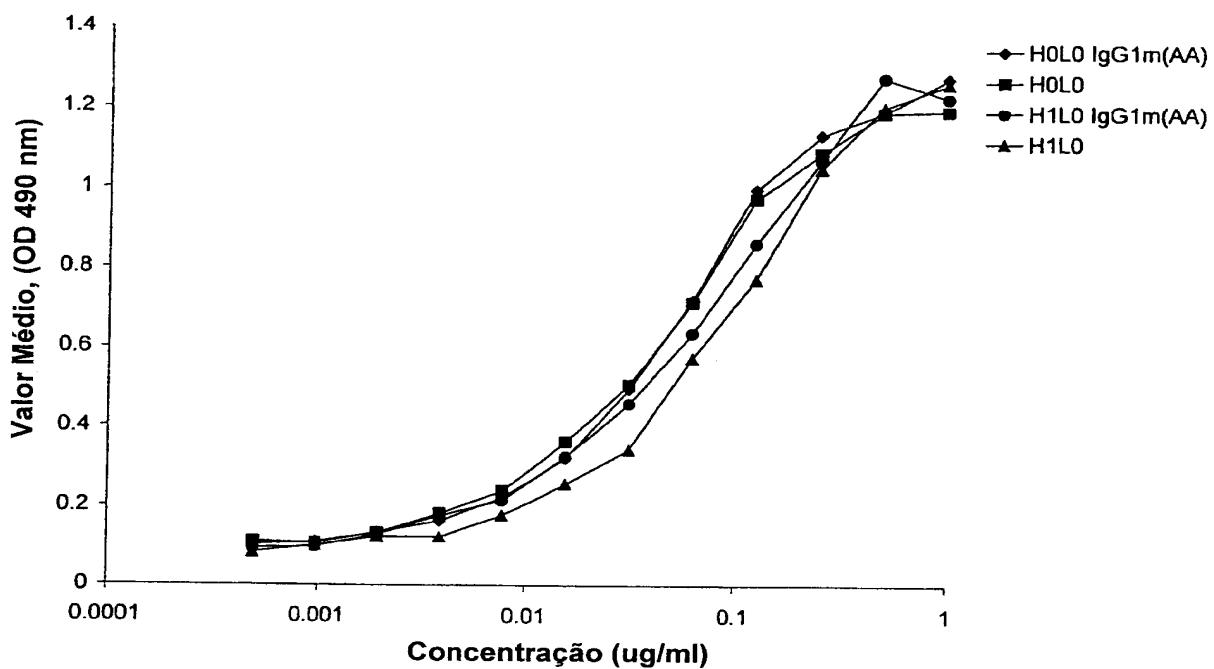
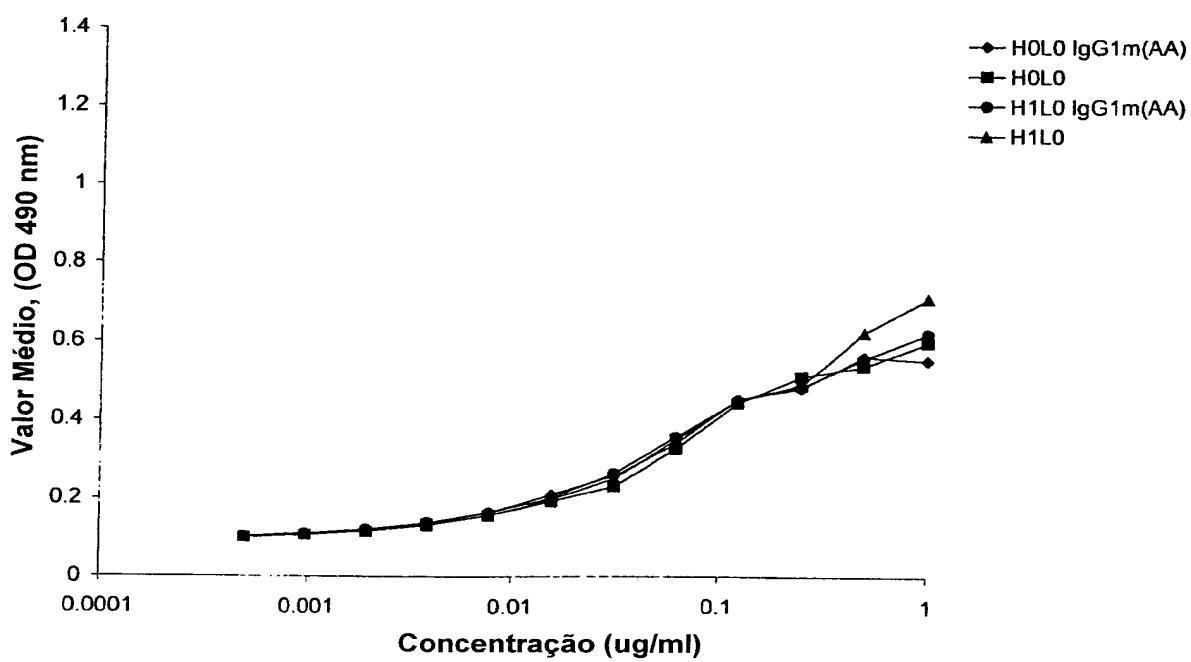
Figura 2C - ELISA de ligação - anticorpos purificados**Figura 2D - ELISA de ligação - anticorpos purificados**

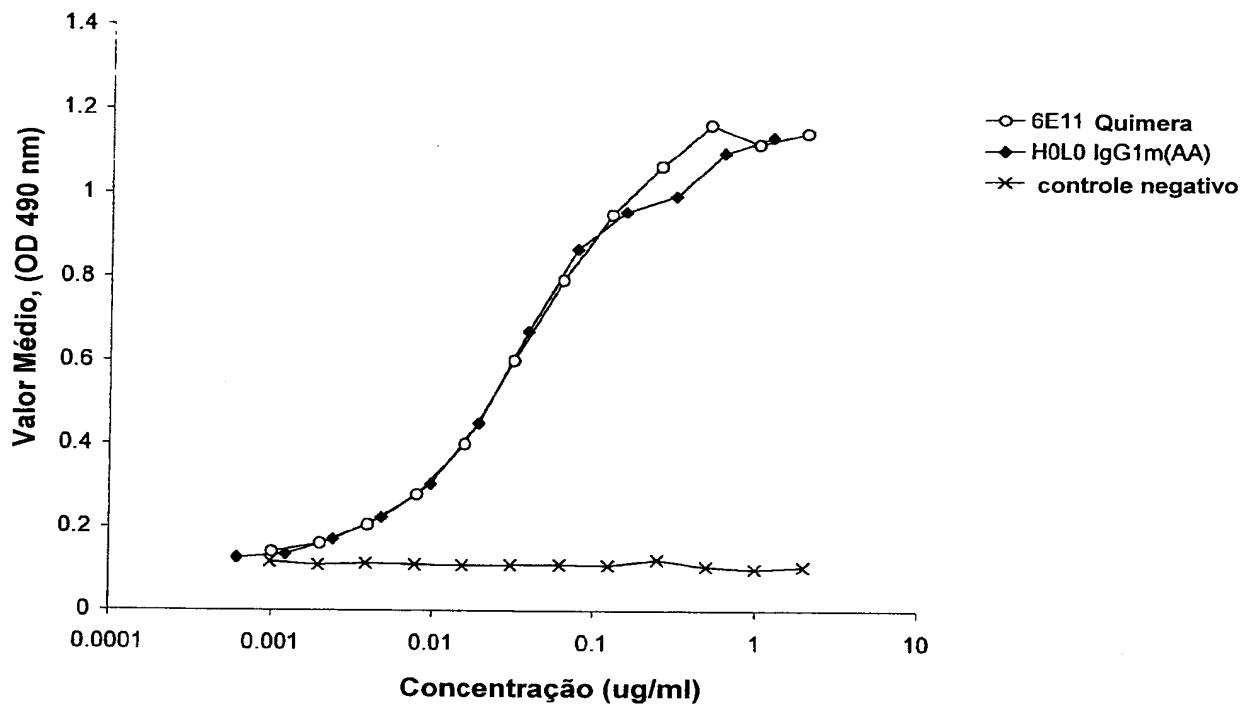
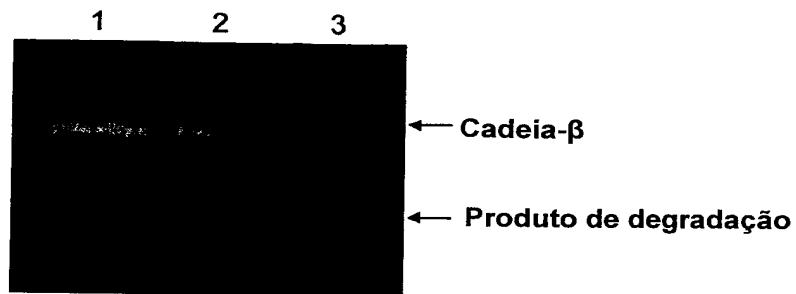
Figura 2E - ELISA de ligação

FIG. 3



1 = Sem anticorpo

2 = Anticorpo de controle negativo

3 = 6E 11

FIG. 4

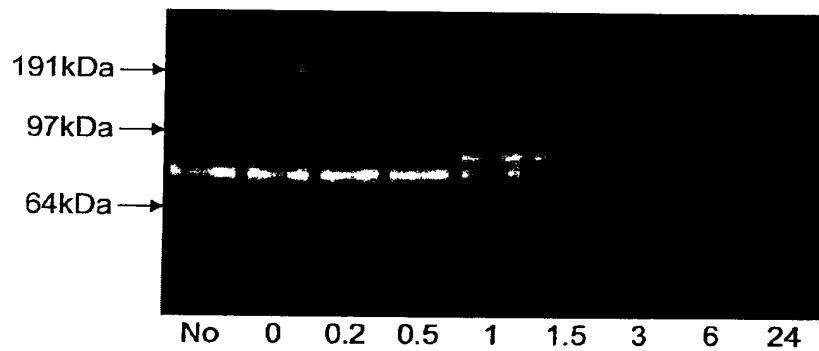


FIG. 5

Linhagem de célula CNI-H838 (pulmão)

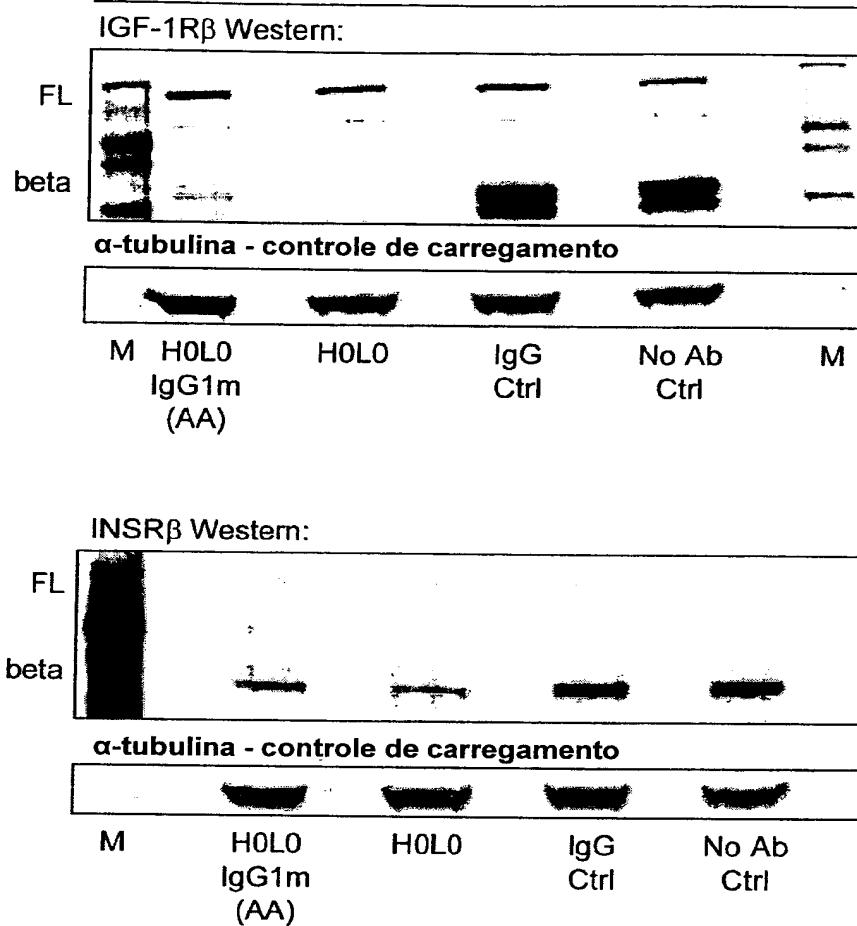


FIG. 6

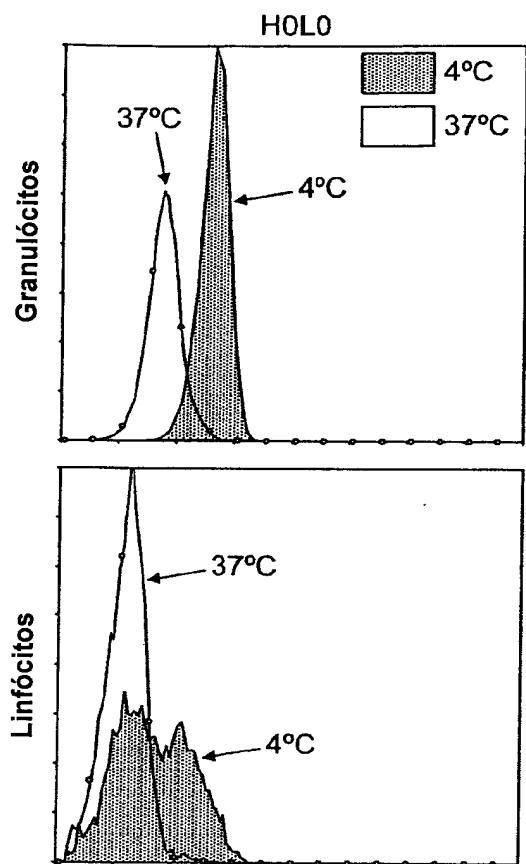


FIG. 7

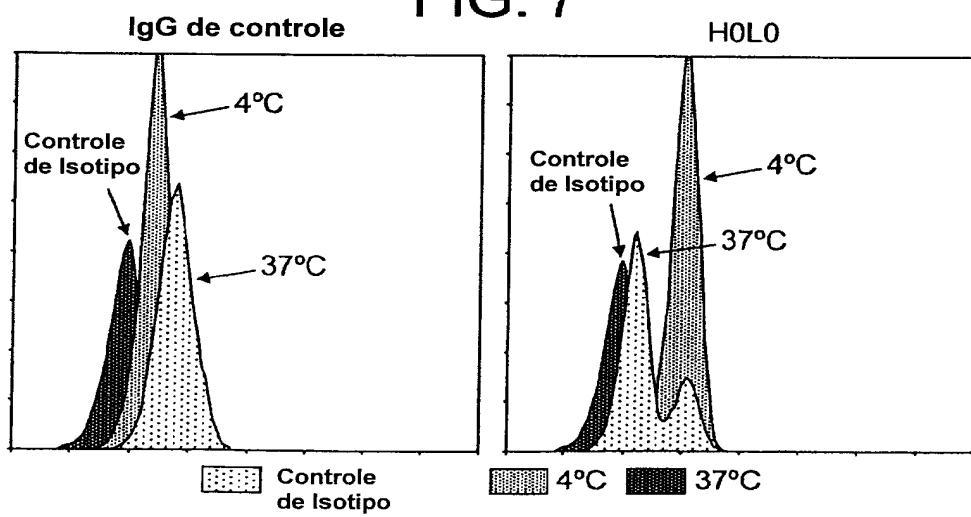


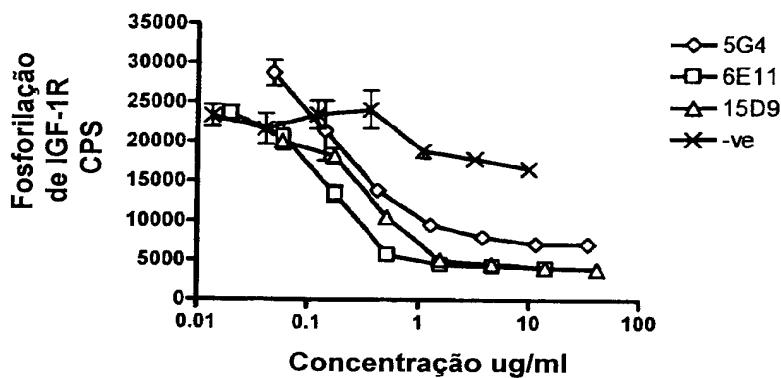
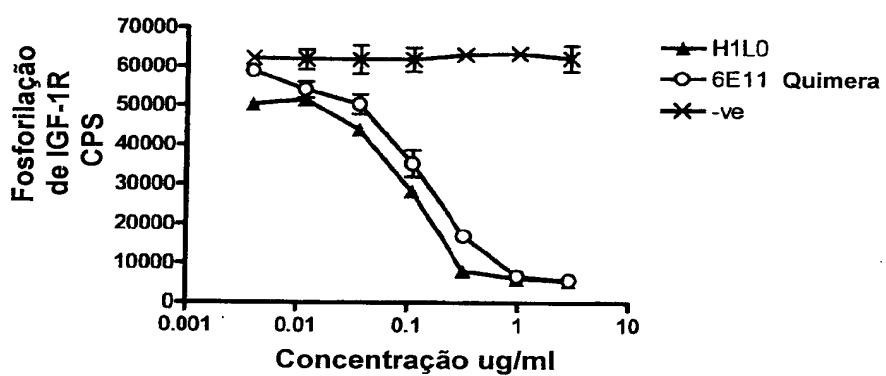
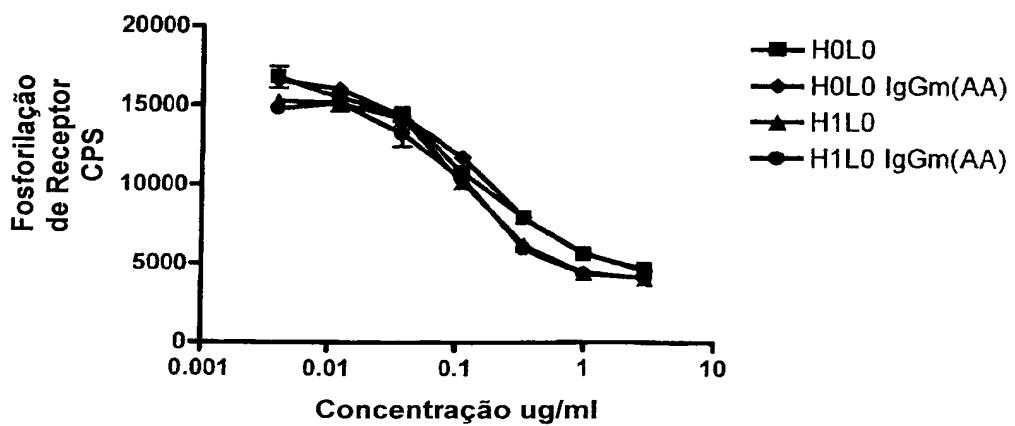
FIG. 8**FIG. 9****FIG. 10**

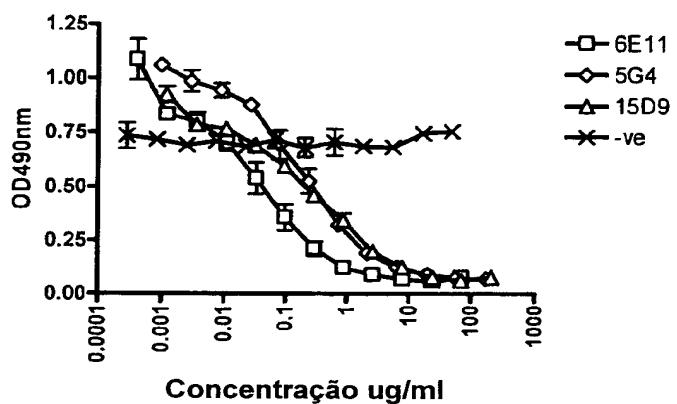
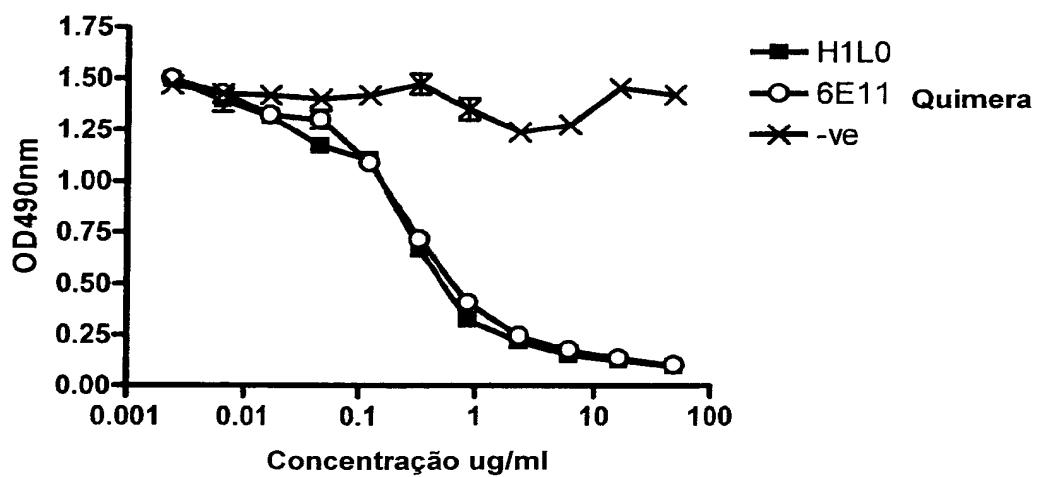
FIG. 11A**FIG. 11B**

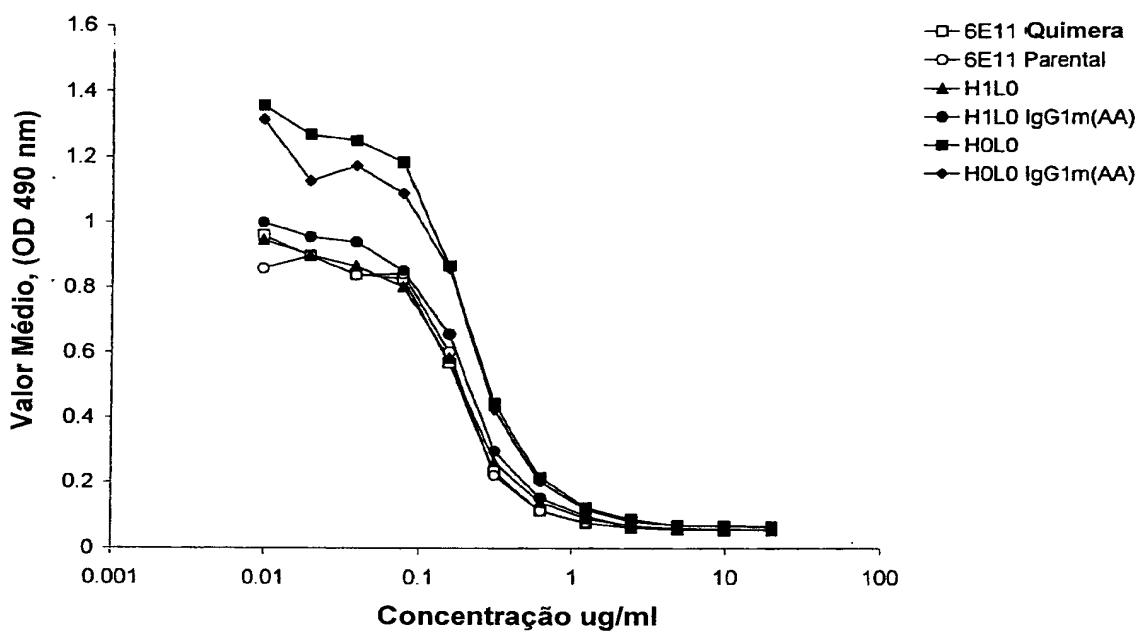
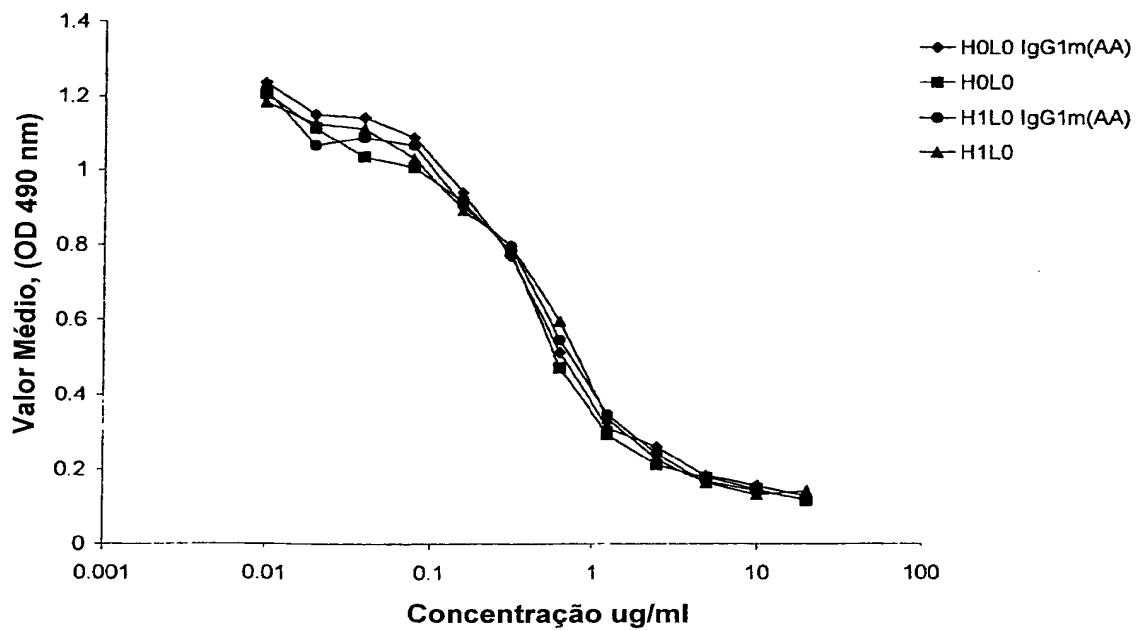
FIG. 12A**FIG. 12B**

FIG. 12C

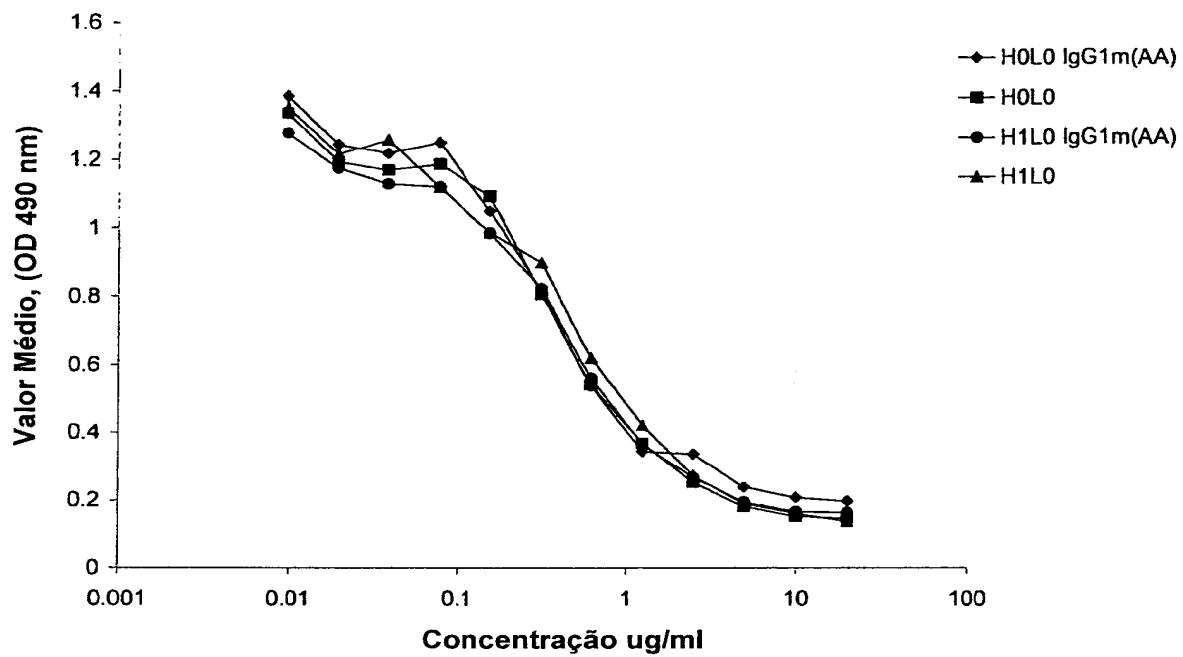


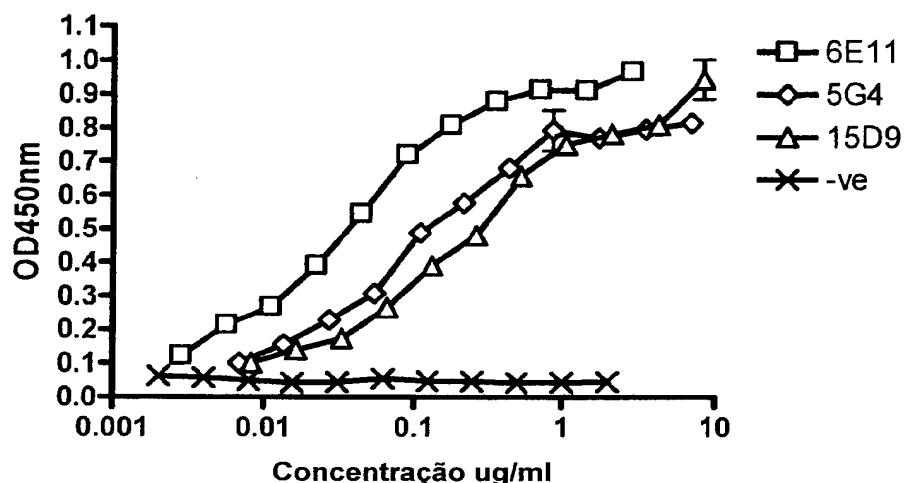
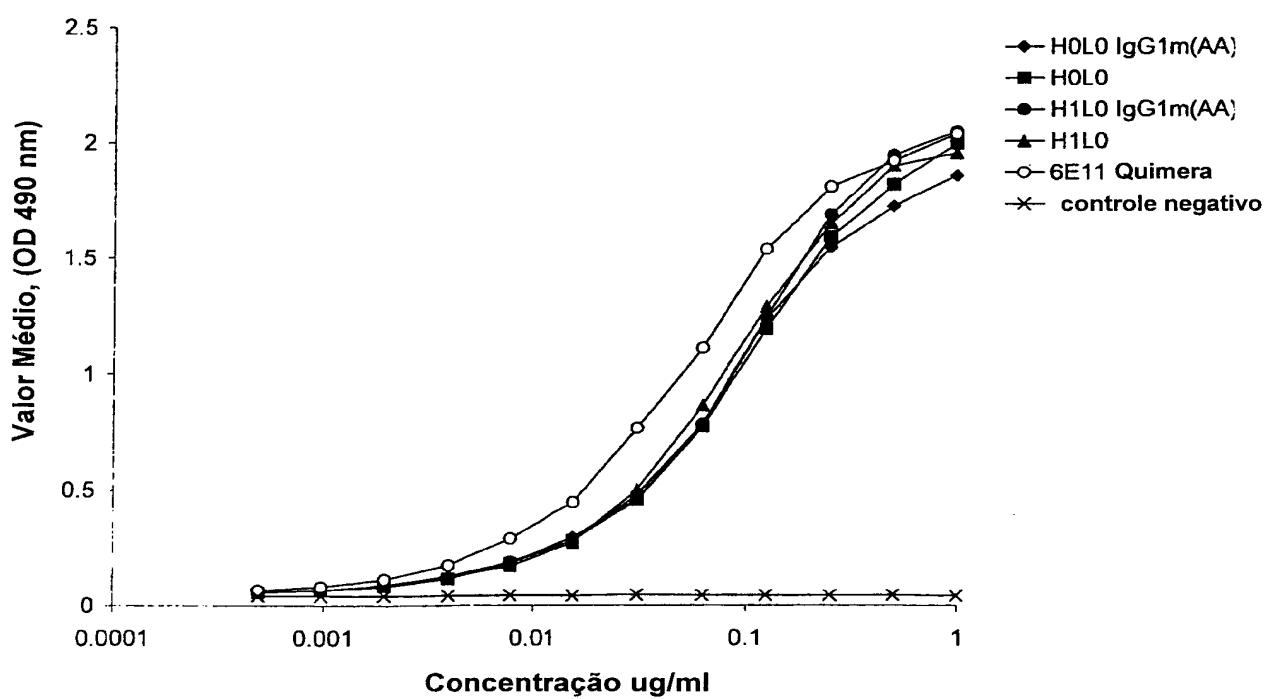
FIG. 13A**FIG. 13B**

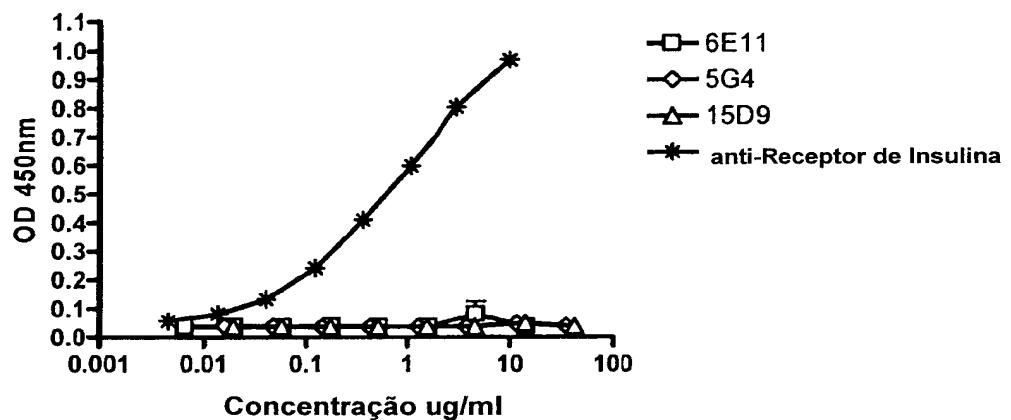
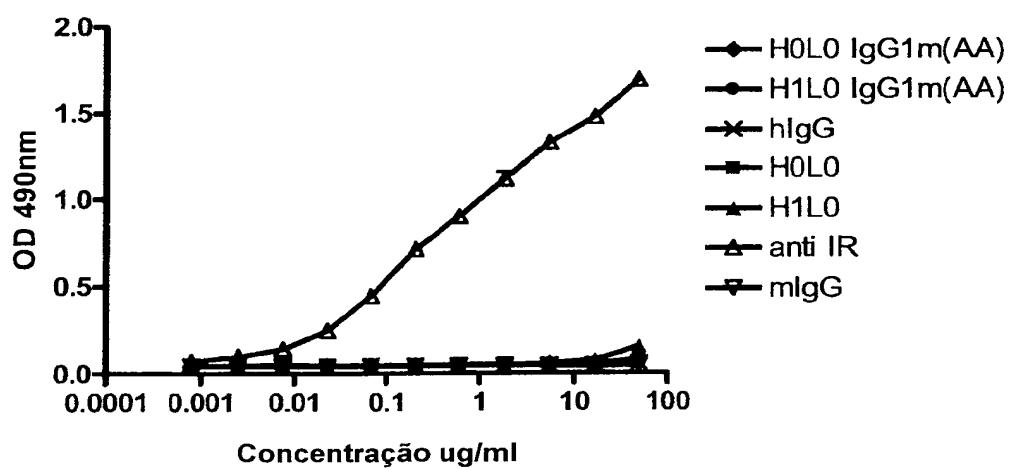
FIG. 14**FIG. 15**

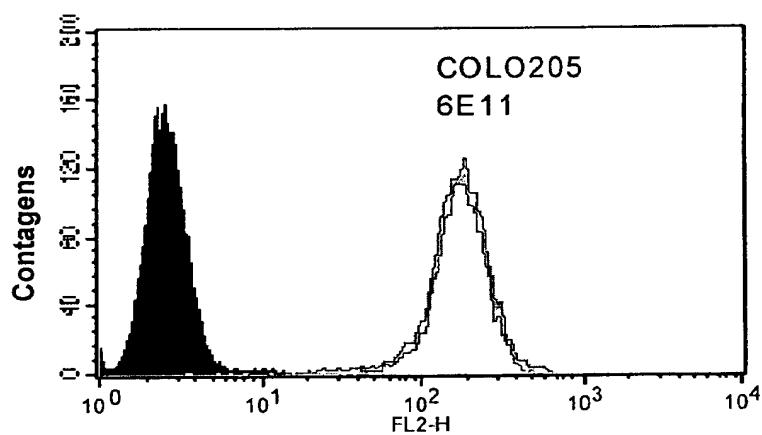
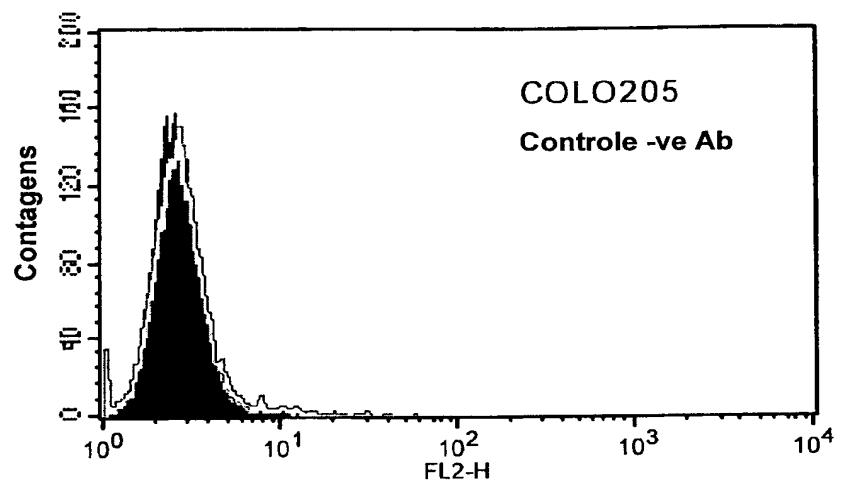
FIG. 16

FIG. 17

NCI-H838

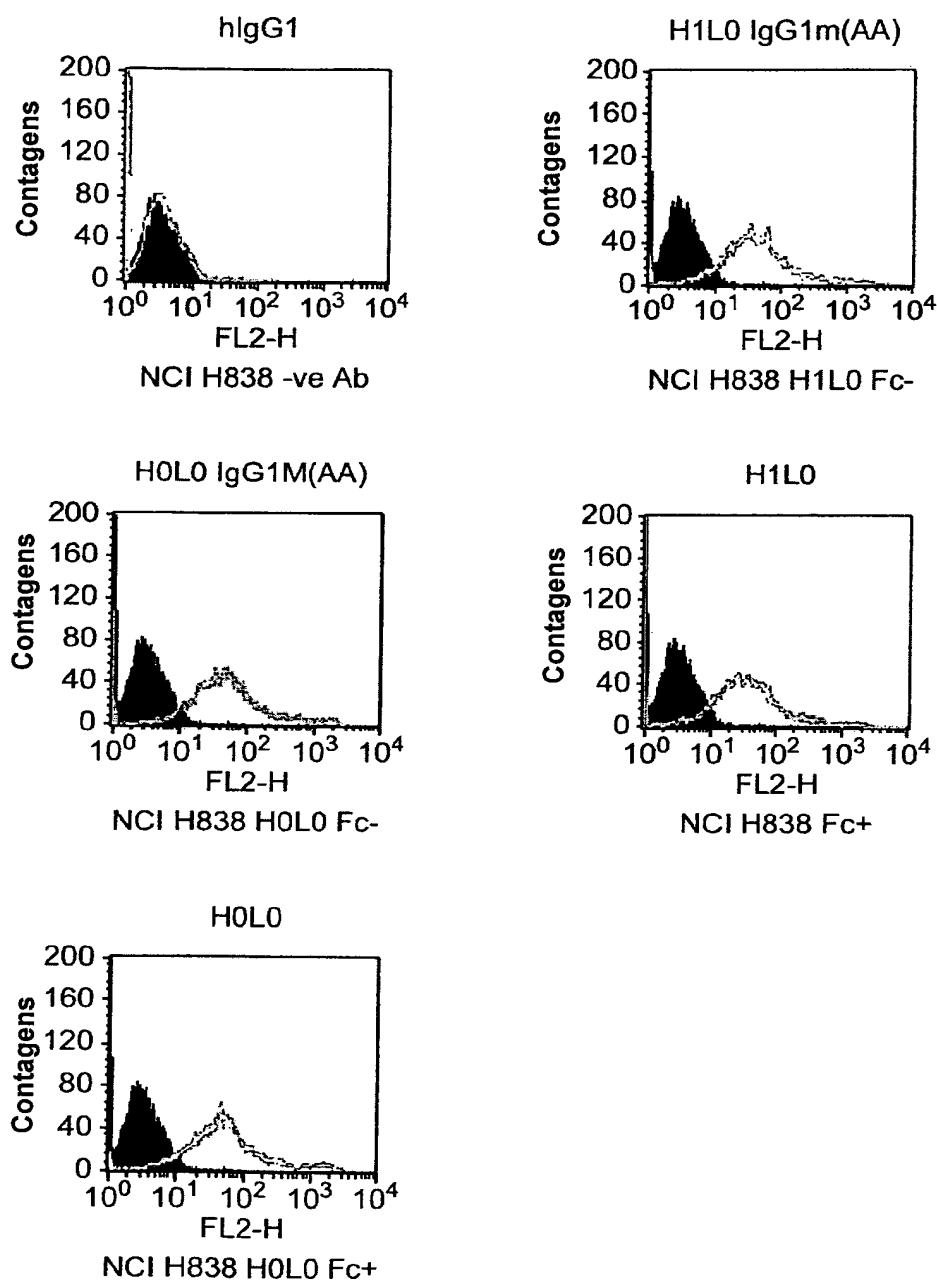


FIG. 18

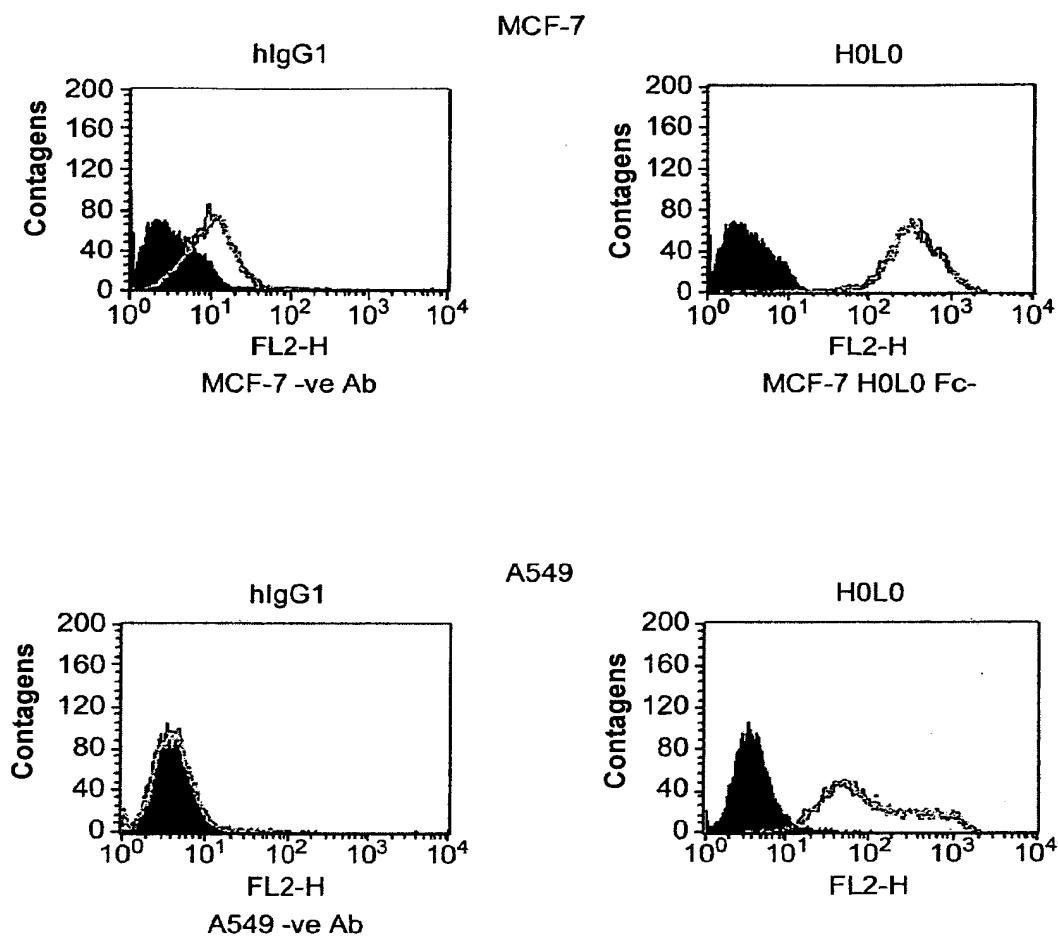
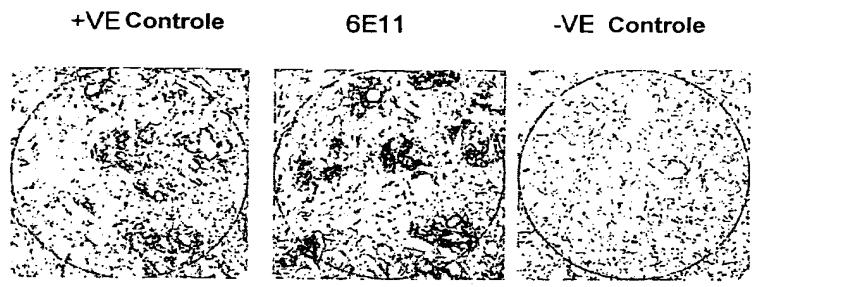
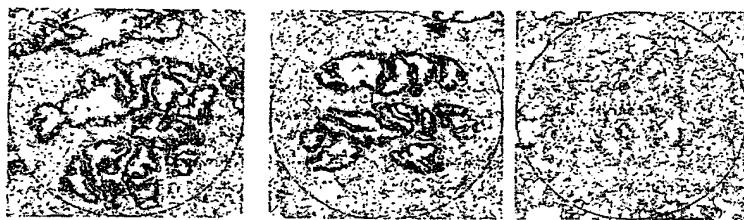


FIG. 19

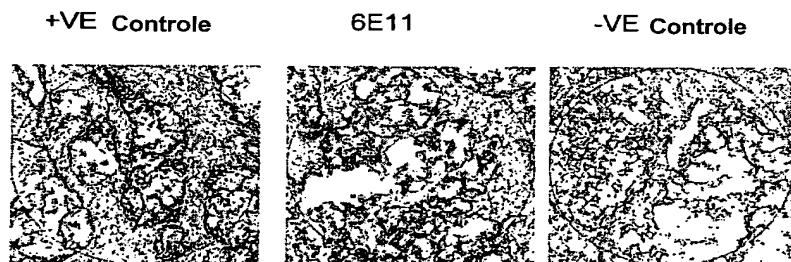


Tecido de próstata canceroso (31824C1) corado com 4 µg/ml de anticorpo

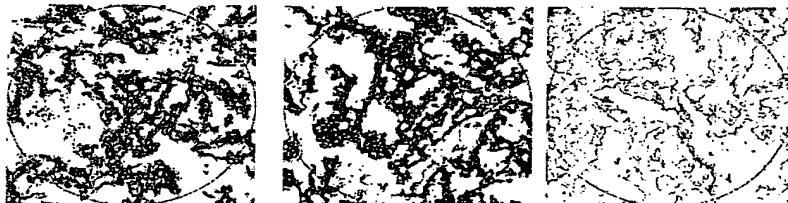


Tecido de próstata "normal" adjacente (31824D1) corado com 4 µg/ml de anticorpo

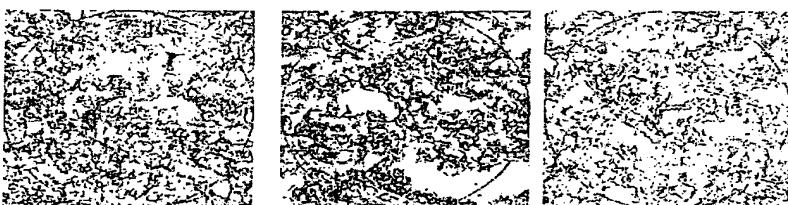
FIG. 20



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

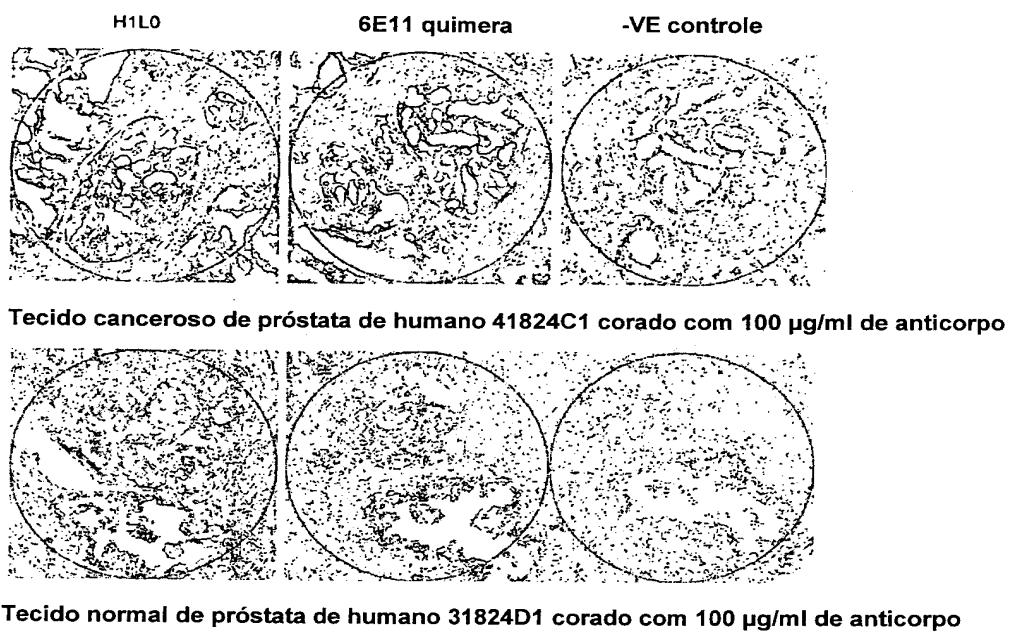


FIG. 22

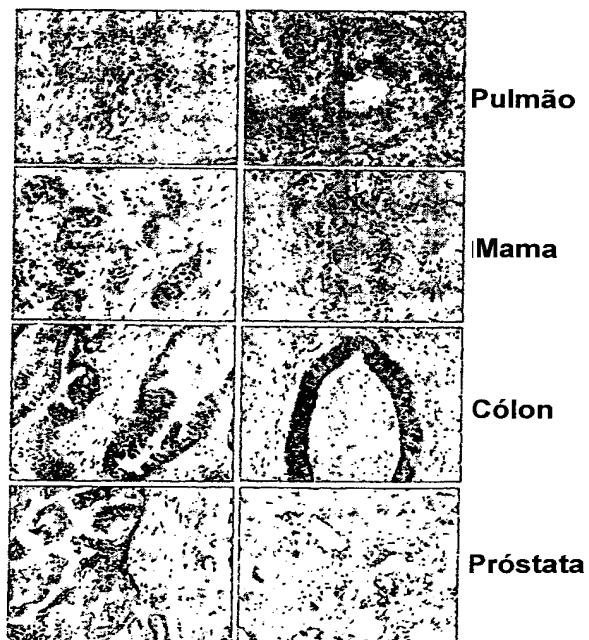


FIG. 23

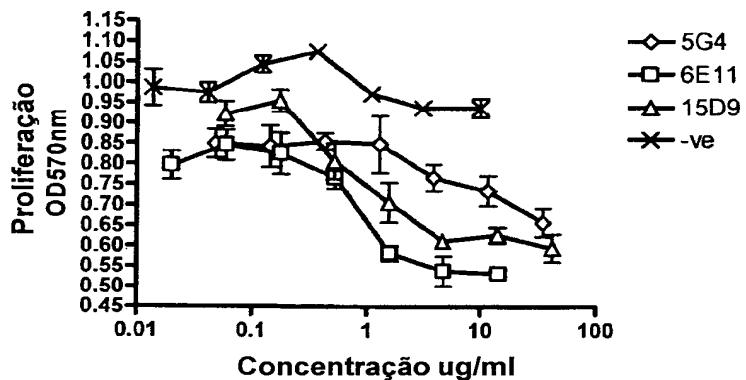


FIG. 24

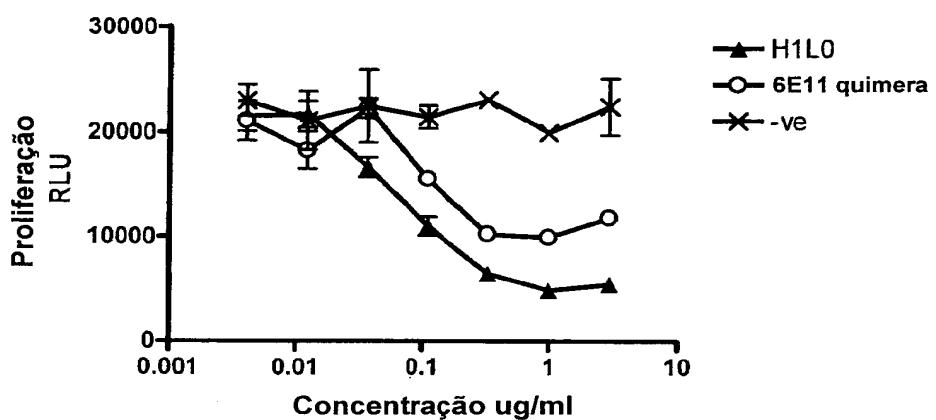


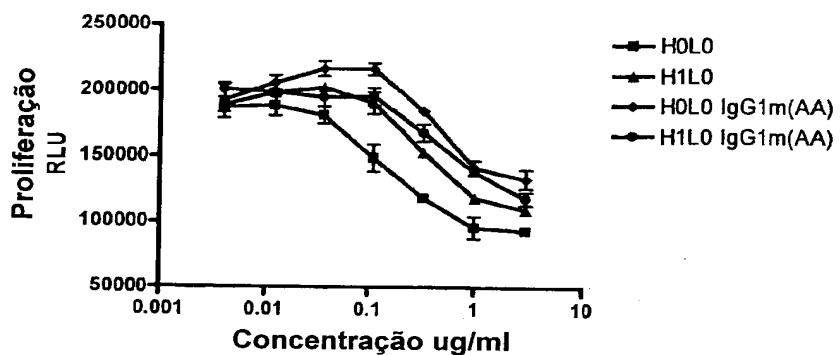
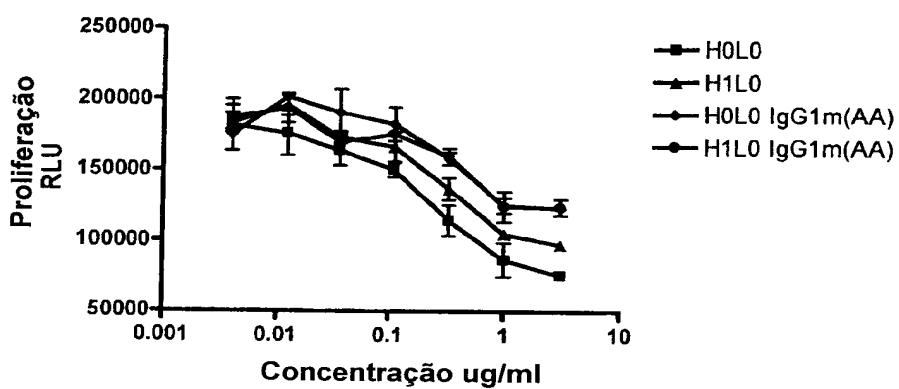
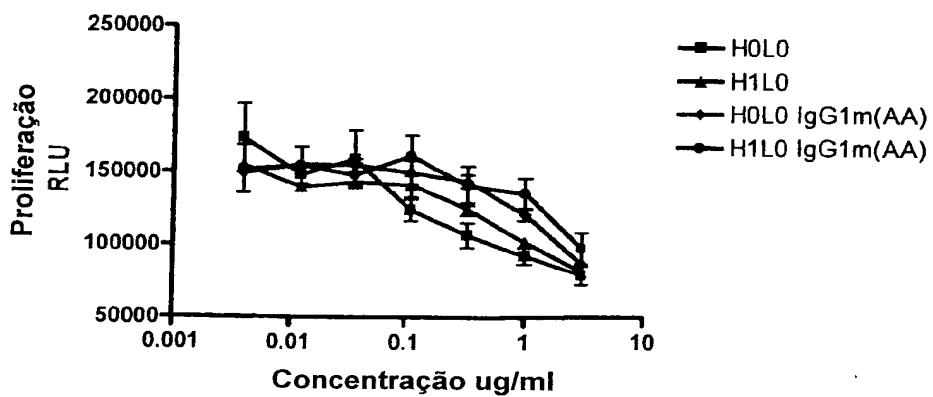
FIG. 25A**FIG. 25B****FIG. 25C**

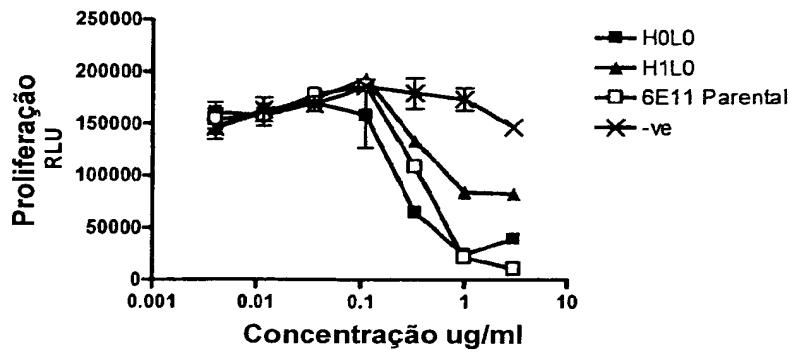
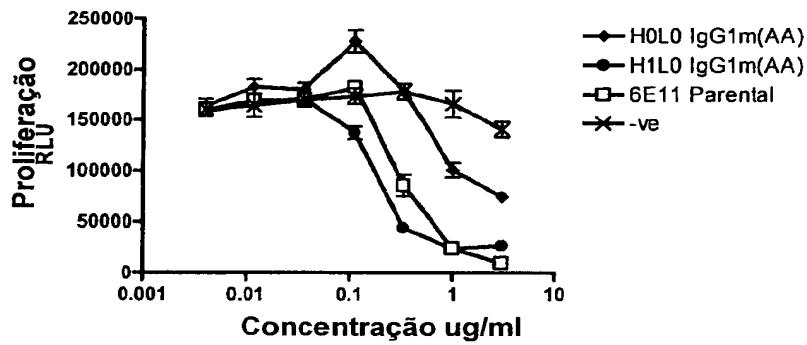
FIG. 25D**FIG. 25E**

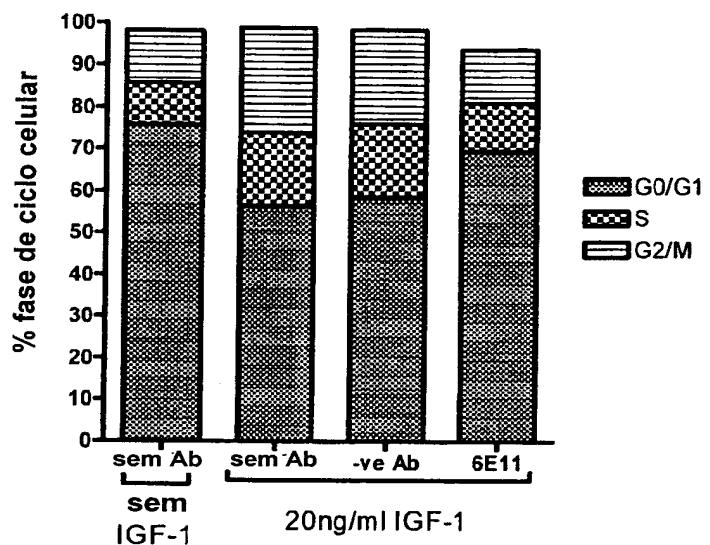
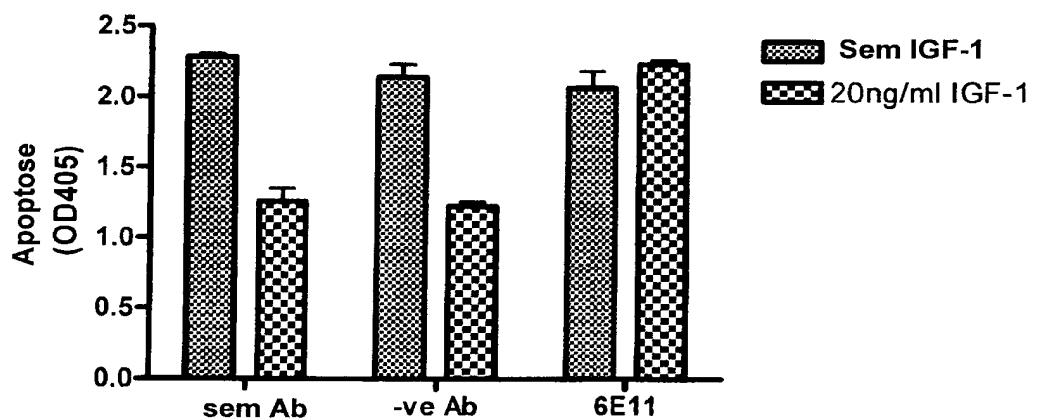
FIG. 26**FIG. 27**

FIG. 28

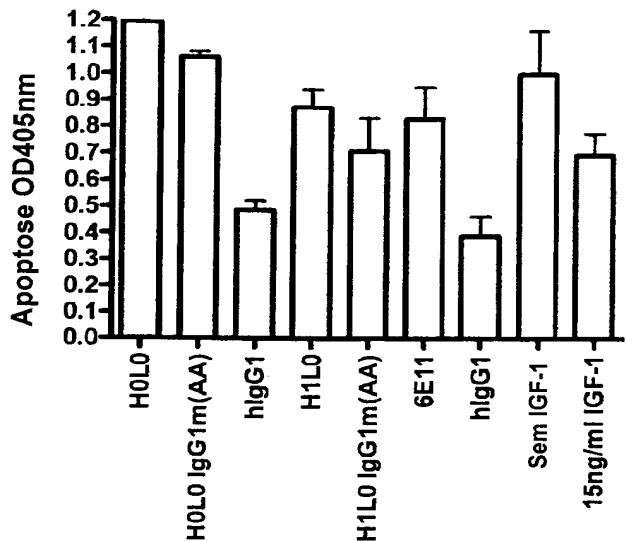


FIG. 29

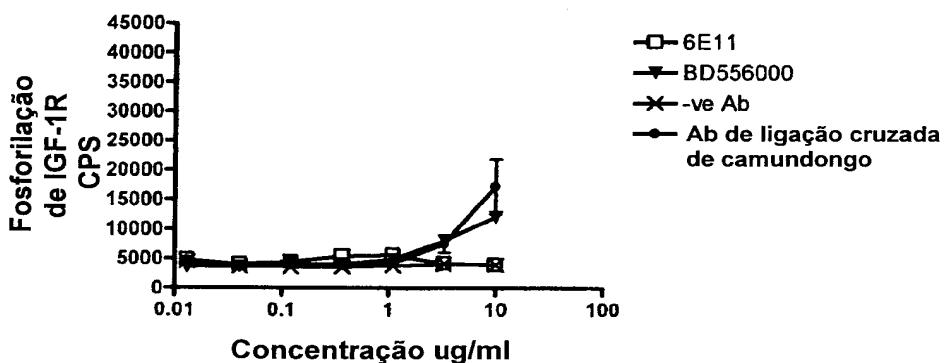


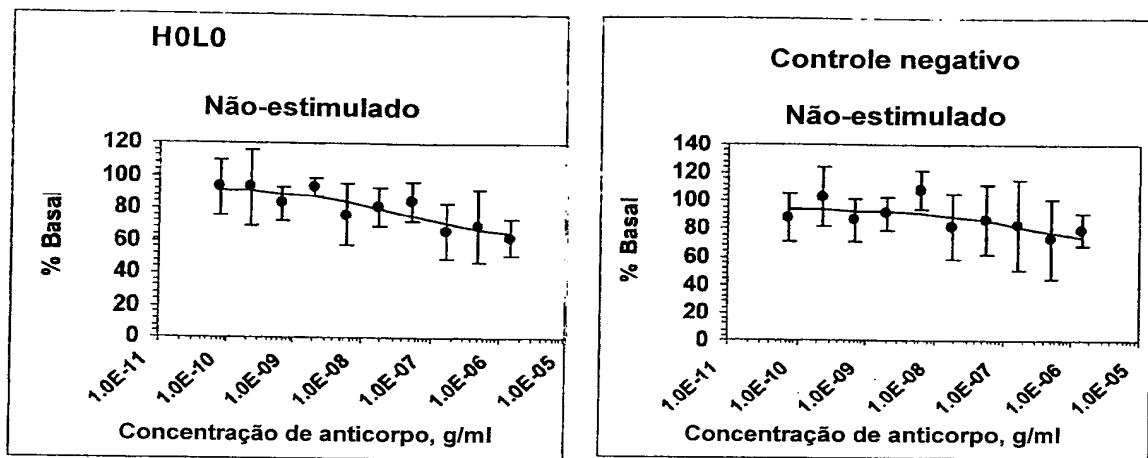
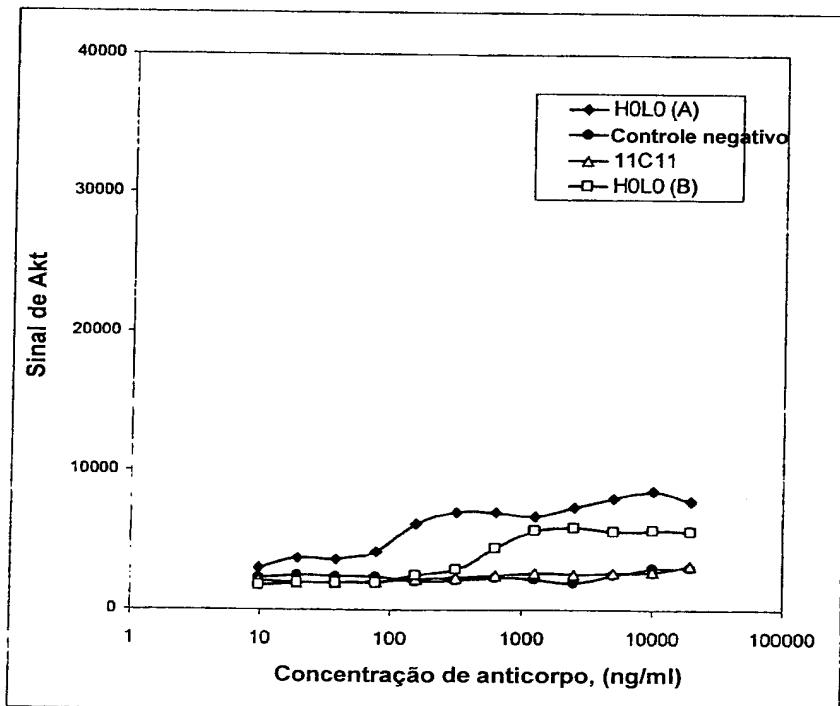
FIG. 30**FIG. 31**

FIG. 32

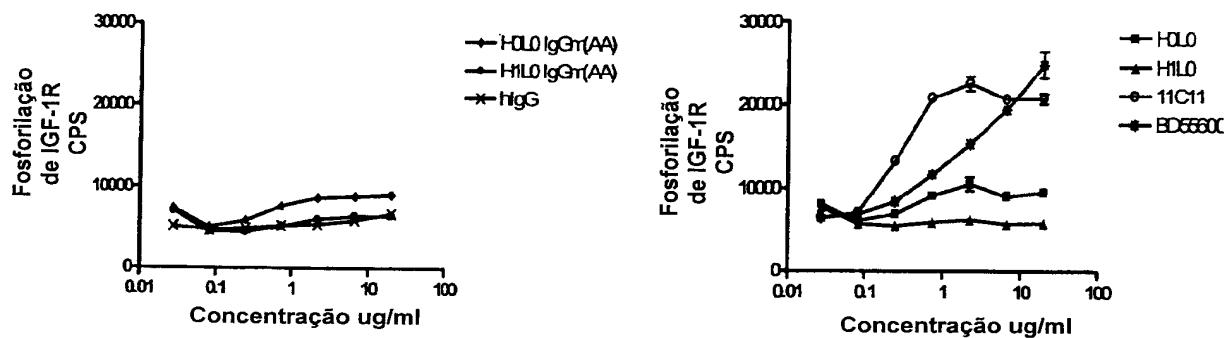


FIG. 33

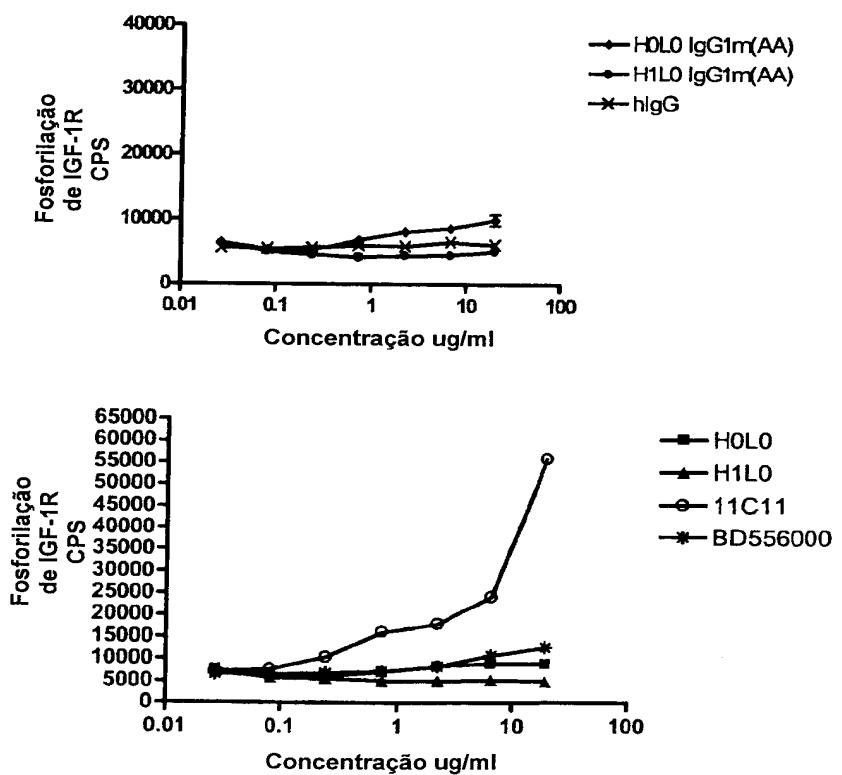


FIG. 34

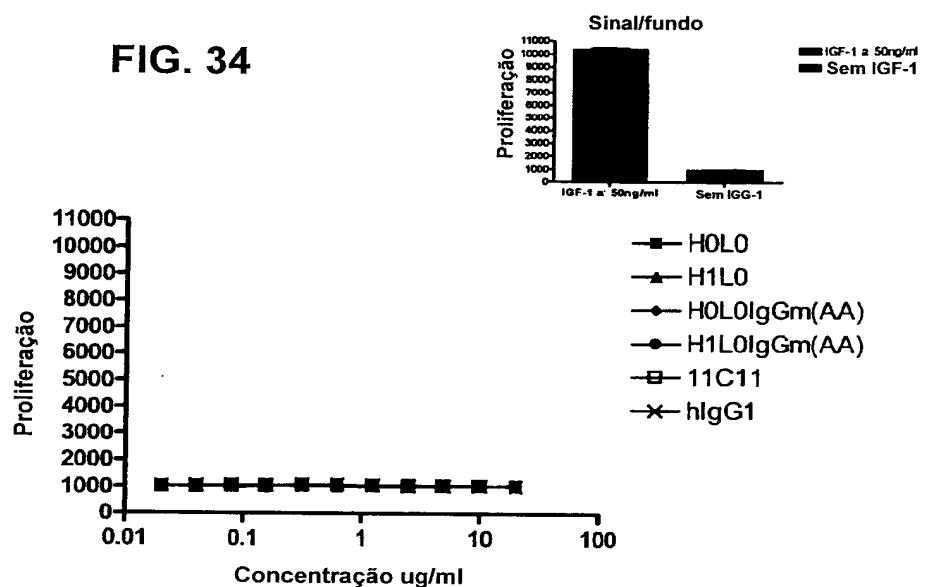


FIG. 35

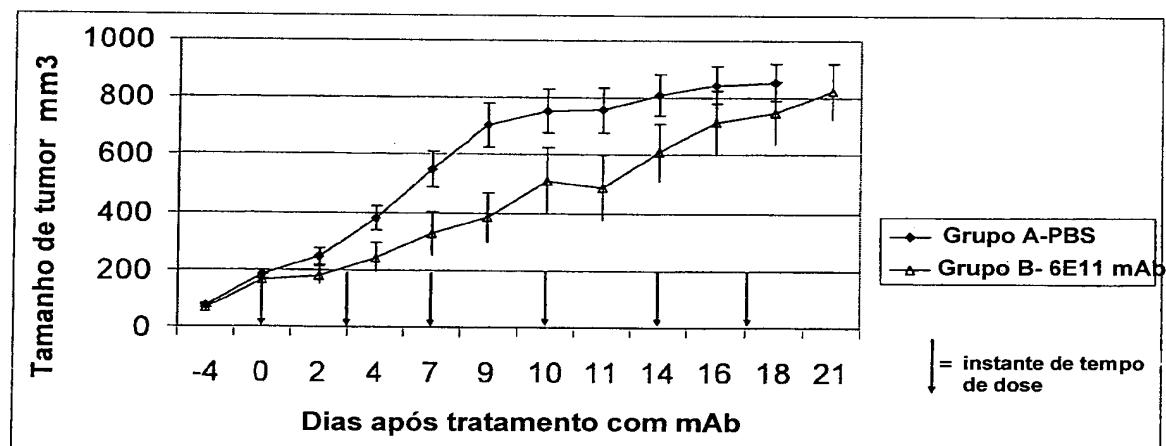


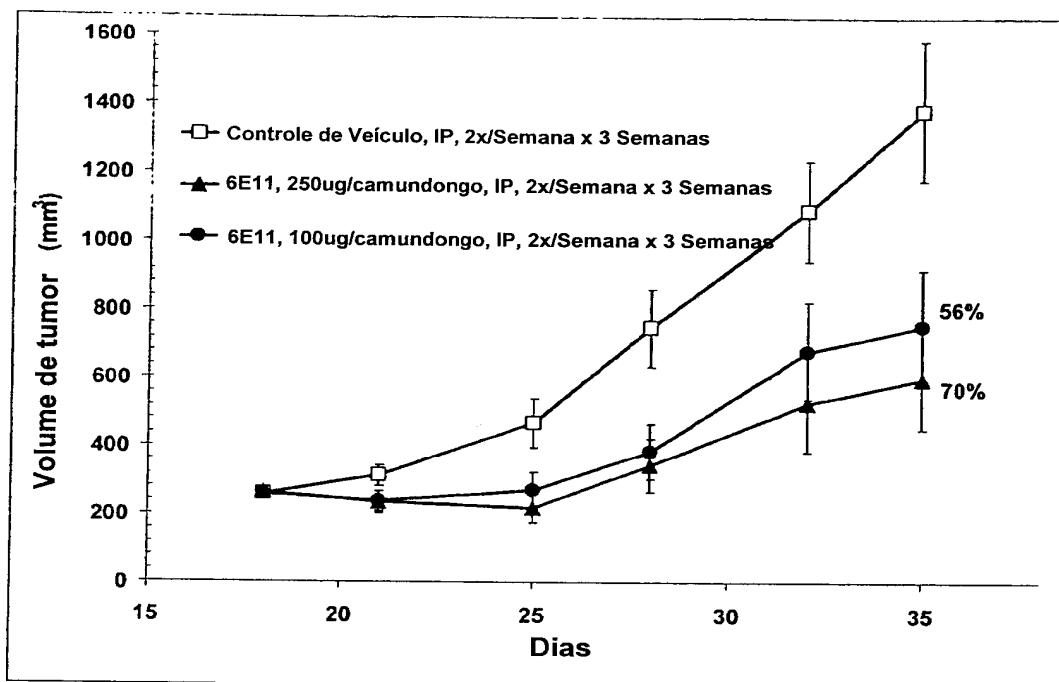
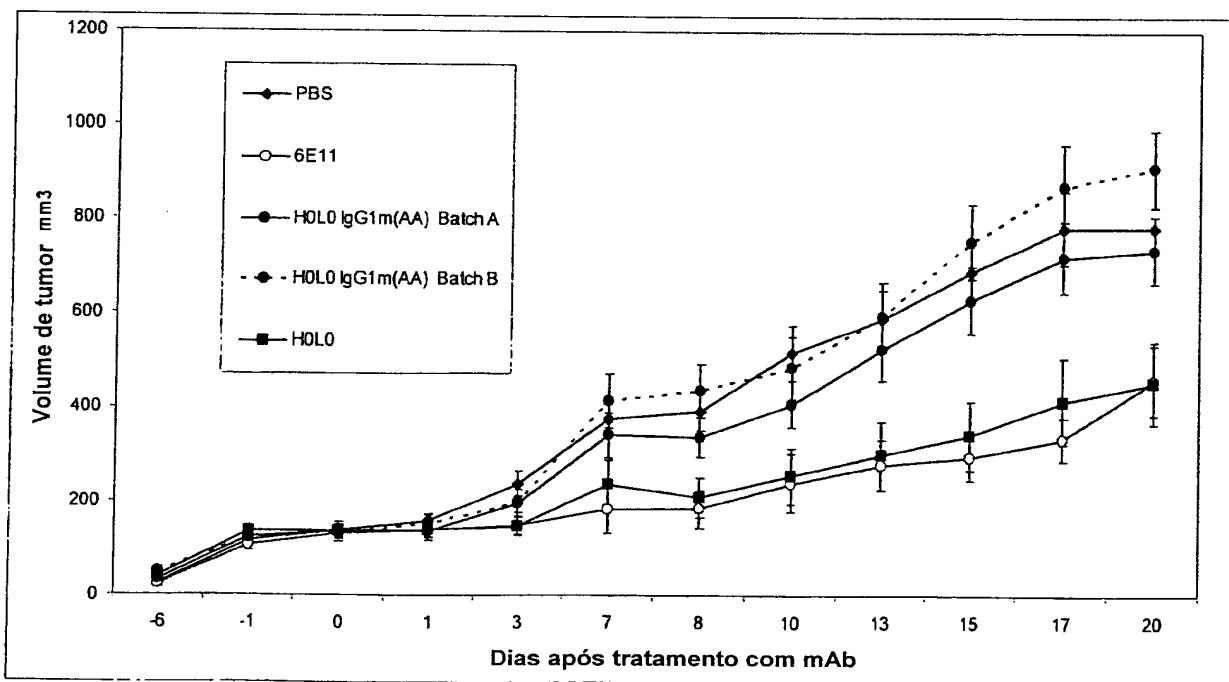
FIG. 36**FIG. 37**

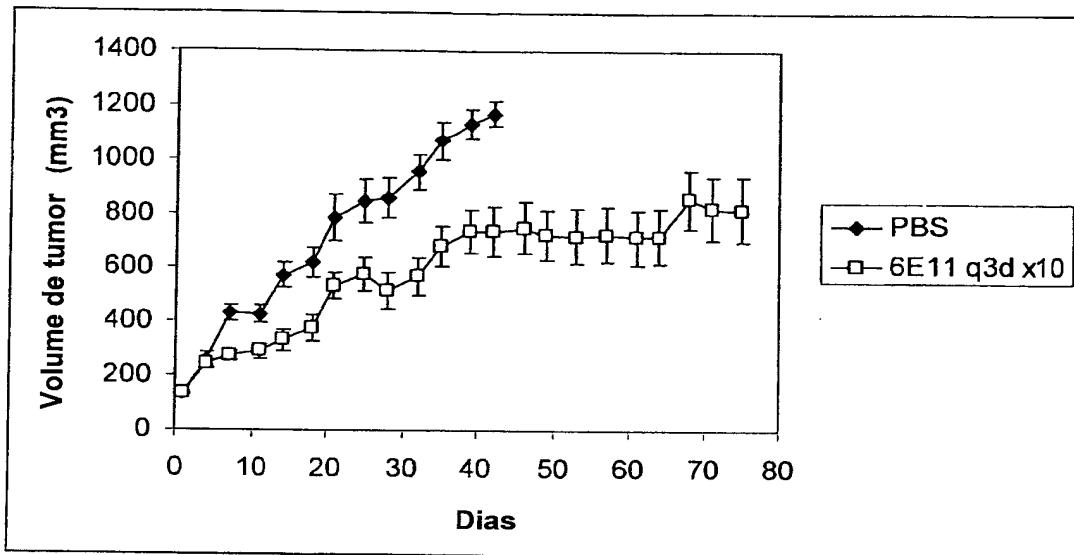
FIG. 38**FIG. 39**

FIG. 40

A

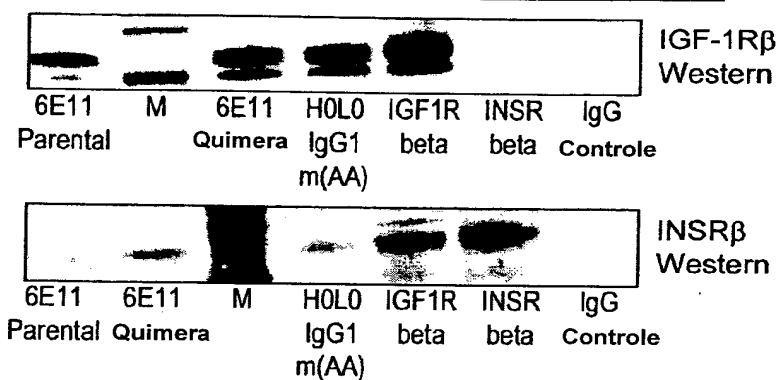
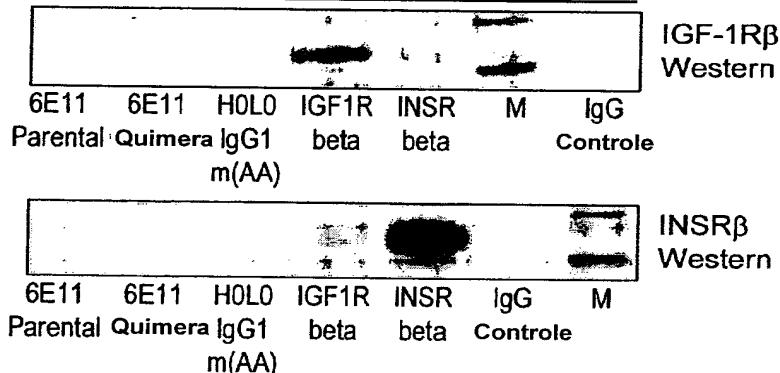
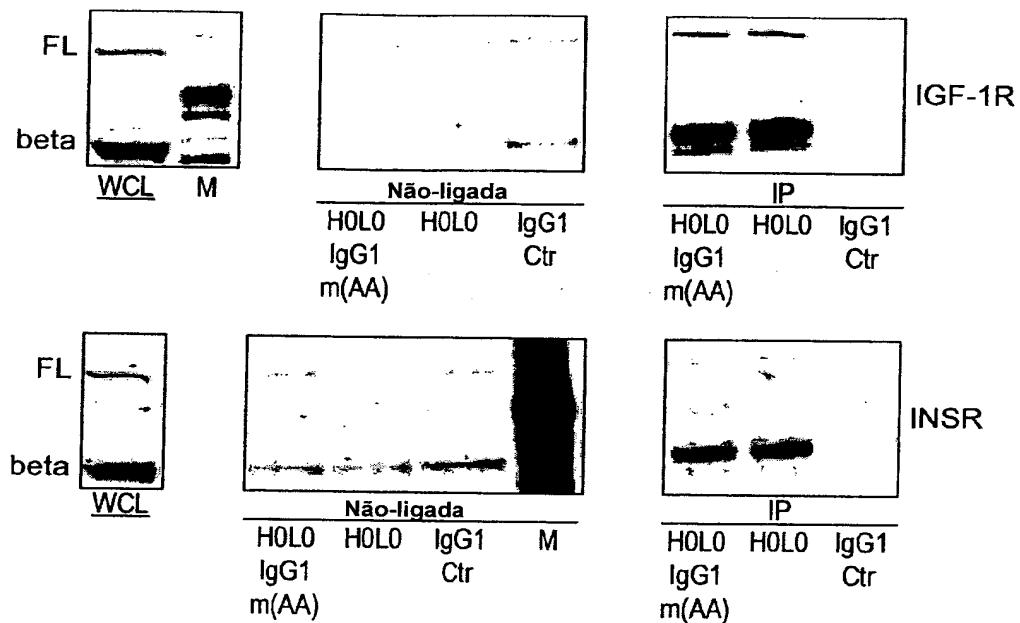
COLO-205 (adenocarcinoma de cólon de humano)NIH3T3 (camundongo) + INSR de humano

FIG. 40 cont.

B

Linhagem de célula COLO-205 (cólon)



Chave:

WCL = lisado de célula inteiro

(Não-ligada) = Fração IP Não-ligada

M = Marcador Mwt

IP = Imunoprecipitação

FIG. 41

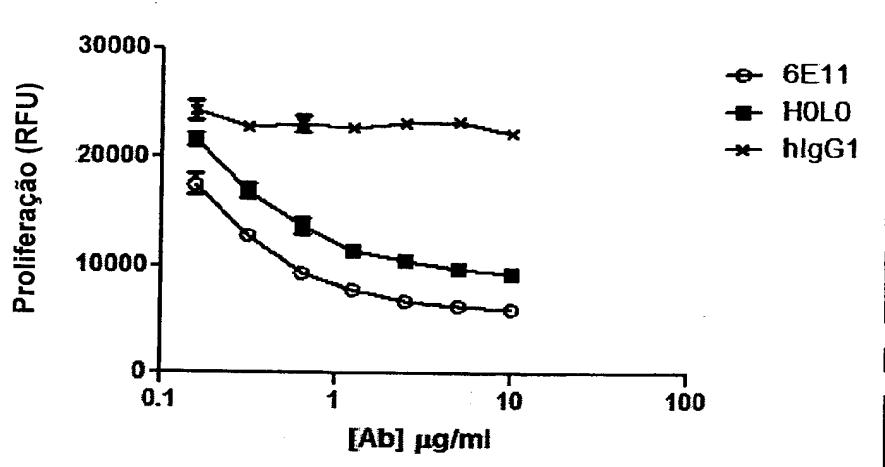


FIG. 42

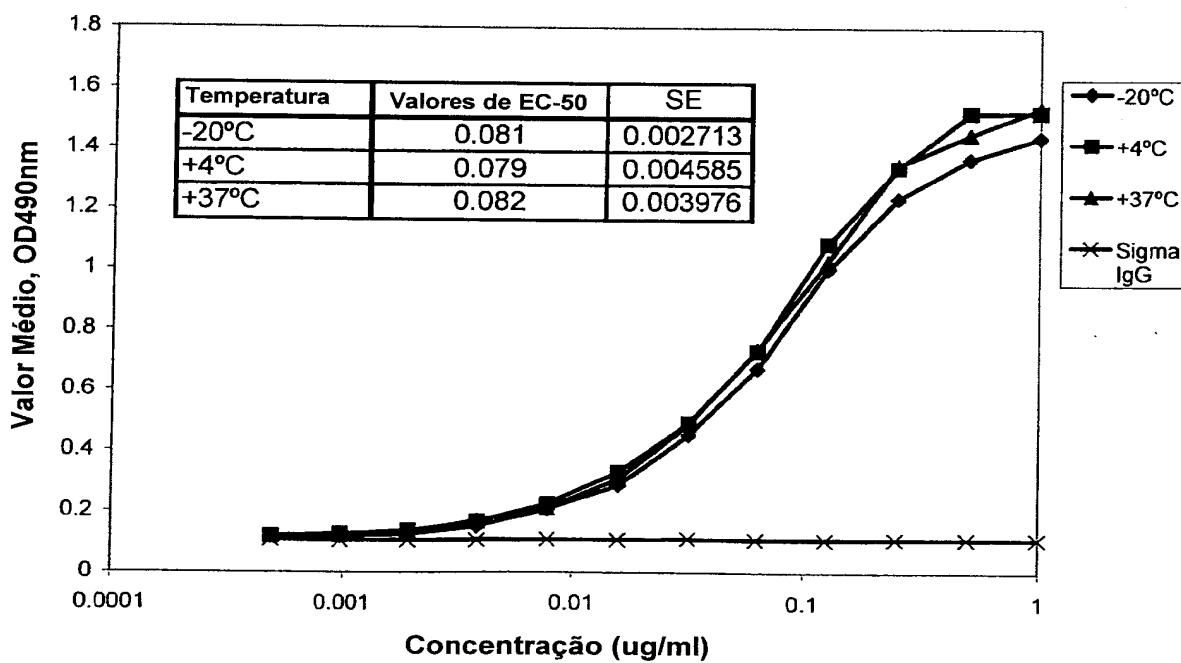
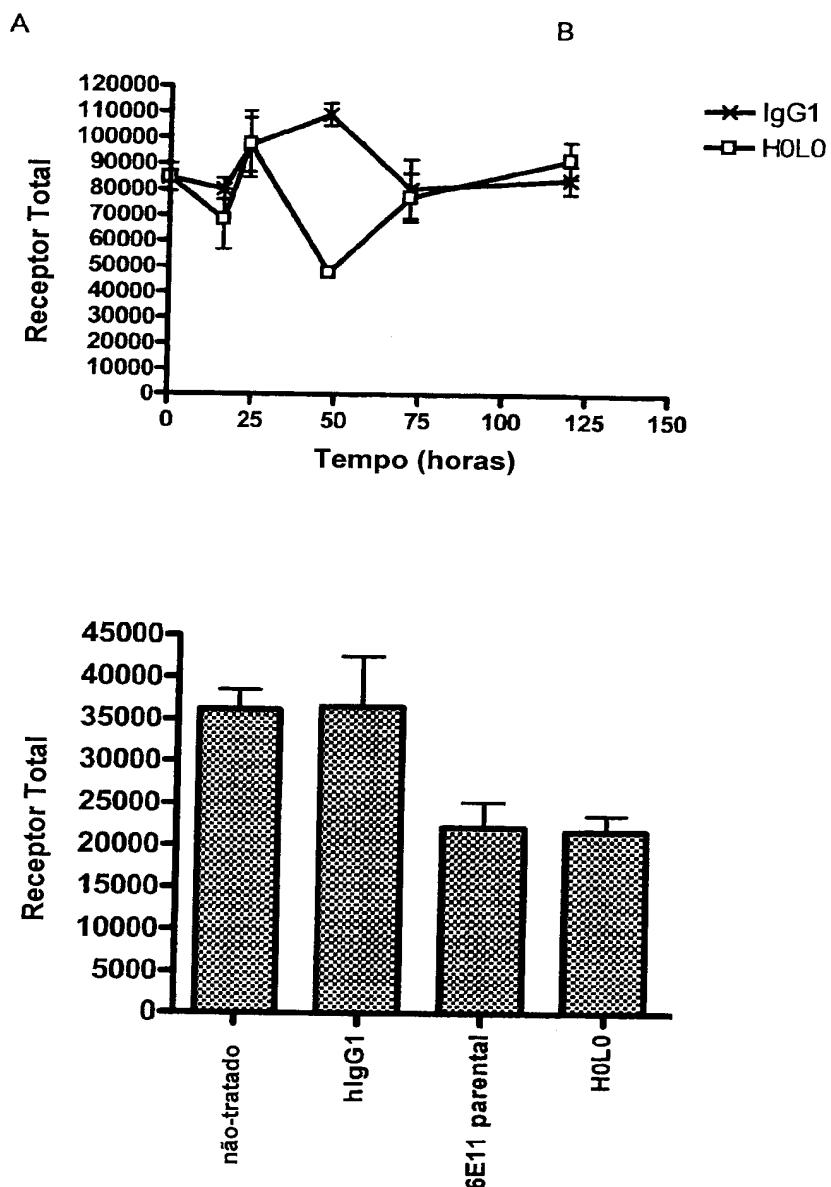


FIG. 43



RESUMO

“ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGANTE DE ANTÍGENO DO MESMO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE TRANSFORMADA, TRANSFECTADA OU TRANSDUZIDA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO 5 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 10 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 15 e usos dos mesmos também estão incluídos dentro do escopo da presente invenção.