



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

(21) **PI0709259-8 A2**

(22) Data de Depósito: 27/03/2007
(43) Data da Publicação: 28/06/2011
(RPI 2112)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/28 2006.01
A61K 39/395 2006.01

(54) Título: **ELEMENTO DE LIGAÇÃO ISOLADO, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, COMPOSIÇÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA IN VITRO, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ELEMENTO DE LIGAÇÃO OU MOLÉCULA DE ANTICORPO, E, USO DE UM ELEMENTO DE LIGAÇÃO OU MOLÉCULA OU MOLÉCULA DE ANTICORPO**

(57) Resumo: ELEMENTO DE LIGAÇÃO ISOLADO, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, COMPOSIÇÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA IN VITRO, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ELEMENTO DE LIGAÇÃO OU MOLÉCULA DE ANTICORPO, E, USO DE UM ELEMENTO DE LIGAÇÃO OU MOLÉCULA DE ANTICORPO. Elementos de ligação para cadeia alfa de receptor para fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF α), especificamente moléculas de anticorpos. Uso dos elementos de ligação no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, p. ex. artrite reumatóide, asma, resposta alérgica, esclerose múltipla, leucemia mieloide e aterosclerose.

(30) Prioridade Unionista: 27/03/2006 US 60/786,569

(73) Titular(es): Medimmune Limited, Zenyth Operations Pty. Ltd

(72) Inventor(es): Andrew Donald Nash, Ema Suzanne Cohen, Louis Jerry Fabri, Matthew Alexander Sleeman, Paula Rosamund Harrison, Ralph Raymond Minter

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007001108 de 27/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/110631 de 04/10/2007

“ELEMENTO DE LIGAÇÃO ISOLADO, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, COMPOSIÇÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA *IN VITRO*, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ELEMENTO DE LIGAÇÃO OU MOLÉCULA DE ANTICORPO, E, USO DE UM ELEMENTO DE LIGAÇÃO OU MOLÉCULA DE ANTICORPO”

A presente invenção refere-se a elementos de ligação para a cadeia alfa do receptor de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSFR α), particularmente moléculas de anticorpos anti-GMCSFR α . Ela também se refere ao uso destes elementos de ligação no tratamento de doenças inflamatórias, respiratórias e autoimunes mediadas com GMCSFR α , incluindo artrite reumatóide, doença pulmonar obstrutiva crônica e esclerose múltipla.

GM-CSF é um citocina pró-inflamatória de tipo I que acentua a sobrevida, proliferação e/ou diferenciação de uma ampla faixa de tipos de células hematopoiéticas incluindo neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e suas células progenitoras. O receptor de GM-CSF é um membro da superfamília de receptores de hematopoietina. Ele é heterodimérico, consistindo de uma subunidade alfa e uma beta. A subunidade alfa é altamente específica para GM-CSF, enquanto que a subunidade beta é compartilhada com outros receptores de citocina, incluindo IL3 e IL5. Isto é refletido numa distribuição mais ampla de tecidos da subunidade de receptor beta. A subunidade alfa, GM-CSFR α , é expressa primariamente em células mielóides e em células não-hematopoiéticas, como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, células endoteliais e células endoteliais respiratórias. GM-CSFR α de comprimento pleno é uma glicoproteína de membrana de tipo I com 400 aminoácidos que pertence à família de receptores de citocina de tipo I, e consiste de um peptídeo-sinal de 22 aminoácidos (posições de 1 a 22), um domínio extracelular de 298 aminoácidos (posições de 23 a 320), um domínio

de transmembrana das posições de 321 a 345 e um curto domínio intracelular de 55 aminoácidos. O peptídeo-sinal é clivado para proporcionar a forma madura de GM-CSFR α como uma proteína de 378 aminoácidos. Clones de cDNA do GM-CSFR α humano e murino encontram-se disponíveis, e, no
5 nível de proteína, as subunidades de receptor apresentam 36% de identidade. GM-CSF é capaz de ligar-se com afinidade relativamente baixa à subunidade α apenas (Kd de 1 a 5 nM) mas nenhuma com a subunidade β apenas. No entanto, a presença de ambas as subunidades α e β resulta em um complexo ligante-receptor de alta afinidade (Kd $\approx$ 100pM). A sinalização de GM-CSF
10 ocorre através de sua ligação inicial à cadeia α do GM-CSFR e, então, reticulação com uma subunidade maior da cadeia β comum para gerar a interação de alta afinidade, que fosforila a via JAK-STAT. A ligação de GM-CSFR ao GMCSF é revista na ref. [1]. Esta interação também é capaz de sinalização através da fosforilação de tirosina e ativação da via de MAP
15 quinase.

Patologicamente, GM-CSF mostrou desempenhar um papel na exacerbação de doenças inflamatórias, respiratórias e autoimunes. Neutralização da ligação de GM-CSF a GM-CSFR α é, portanto, uma abordagem terapêutica para o tratamento de doença e condições mediadas
20 com GM-CSFR.

Nicola *et al.* [2] descreveram um anticorpo murino contra GM-CSFR α humano, denominado 2B7-17-A ou "2B7", que foi reportado como apresentando uma afinidade relativamente alta por GM-CSFR α humano, e como sendo um inibidor potente da ação biológica do GM-CSF humano em
25 diversos ensaios biológicos diferentes. O anticorpo 2B7 encontra-se disponível comercialmente junto à Chemicon como MAB1037, e a folha de dados do produto [*Product Data Sheet*] para MAB1037 indica que é um inibidor potente da ação biológica do GM-CSF. 2B7 também foi revelado no WO94/09149.

Mediante o uso de uma combinação de seleções de bibliotecas de fagos de scFv não tratados, mutagênese randômica e ensaios biológicos e bioquímicos projetados apropriadamente (ver a Parte Experimental abaixo), nós identificamos moléculas de anticorpos altamente potentes que se ligam a GM-CSFR α humano e inibem a ação do GM-CSF humano em seu receptor. Os resultados aqui apresentados indicam que nossos anticorpos ligam-se a uma região ou epítipo diferente de GM-CSFR α em comparação com o conhecido anticorpo anti-GM-CSFR α 2B7, e, surpreendentemente, são ainda mais potentes do que 2B7 como demonstrado numa variedade de ensaios biológicos.

Assim, esta invenção refere-se a elementos de ligação que se ligam a GM-CSFR α humano e inibem a ligação de GM-CSF humano a GM-CSFR α . Elementos de ligação da invenção podem ser antagonistas de GM-CSFR. Os elementos de ligação podem ser inibidores reversíveis competitivos da sinalização de GM-CSF através de GM-CSFR.

Anticorpos e outros elementos de ligação da invenção são particularmente valiosos na ligação e neutralização de GM-CSFR α , e, assim, são úteis nos tratamentos para doenças mediadas com GM-CSFR α , incluindo doenças inflamatórias e autoimunes, como indicado pela experimentação ali contida e corroborando adicionalmente a literatura técnica. Por exemplo, nós demonstramos em ensaios à base de células que anticorpos da invenção são capazes de inibir a liberação de citocinas (p. ex. IL-6 e TNF α) induzida por ligação de GM-CSF nativo a seu receptor. Como explicado mais detalhadamente abaixo, a inibição da atividade de GM-CSF por meio do bloqueio da ligação a GM-CSFR α é uma abordagem terapêutica ao tratamento de referidas doenças como artrite reumatóide (RA), asma, inflamação das vias aéreas induzida com fumaça, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), resposta alérgica, esclerose múltipla (MS), leucemia mielóide e aterosclerose.

Elementos de ligação de acordo com a invenção geralmente ligam-se ao domínio extracelular do GM-CSFR α . De preferência, um elemento de ligação da invenção liga-se pelo menos a um radical de Tyr-Leu-Asp-Phe-Gln (YLDFQ), SEQ ID NO: 201, nas posições de 226 a 230 de GM-CSFR α humano maduro (SEQ ID NO: 206). O elemento de ligação pode ligar-se a pelo menos um resíduo na sequência YLDFQ do GM-CSFR α humano, p. ex. ele pode ligar-se a um, dois, três ou quatro radicais da sequência YLDFQ. Assim, o elemento de ligação pode reconhecer um ou mais radicais nesta sequência, e opcionalmente ele pode ligar-se também a radicais flanqueadores adicionais ou radicais estruturalmente adjacentes no domínio extracelular de GM-CSFR α .

A ligação pode ser determinada por meio de qualquer método vantajoso, por exemplo, é possível usar uma varredura de ligação de peptídeo, como um ensaio imunológico ligado a enzima (ELISA) baseado em PEPSCAN, como descrito detalhadamente alhures aqui. Em uma varredura de ligação de peptídeo, como do tipo proporcionado por Sistemas PEPSCAN, peptídeos curtos que se sobrepõem derivados do antígeno são selecionados sistematicamente quanto à ligação a um membro de ligação. Os peptídeos podem ser acoplados covalentemente a uma superfície de suporte para formar um conjunto de peptídeos. Em resumo, uma varredura de ligação de peptídeo (p. ex. "PEPSCAN") envolve a identificação (p. ex. usando ELISA) de um conjunto de peptídeos ao que o elemento de ligação se liga, sendo que os peptídeos apresentam sequências de aminoácidos correspondentes a fragmentos da SEQ ID NO: 206 (p. ex. peptídeos de cerca de 15 radicais contíguos da SEQ ID NO: 206), e alinhando-se os peptídeos para determinar uma impressão molecular de radicais ligados pelo elemento de ligação, sendo que a impressão molecular compreende radicais comuns a peptídeos que se superpõem. De acordo com a invenção, a impressão molecular identificada pela varredura de ligação de peptídeo ou PEPSCAN pode compreender pelo

menos um radical de YLDFQ correspondendo às posições de 226 a 230 da SEQ ID NO: 206. A impressão molecular pode compreender um, dois, três, quatro ou todos os radicais de YLDFQ. Um elemento de ligação de acordo com a invenção pode ligar-se a um fragmento de peptídeo (p. ex. de 15 radicais) da SEQ ID NO: 206 compreendendo um ou, mais preferivelmente, todos os radicais YLDFQ correspondentes às posições de 226 a 230 da SEQ ID NO: 206, p. ex. como determinado por uma varredura de ligação de peptídeo ou método PEPSCAN aqui descrito. Assim, um elemento de ligação da invenção pode ligar-se a um peptídeo apresentando uma seqüência de aminoácidos de 15 radicais contíguos da SEQ ID NO: 206, sendo que a seqüência de 15 radicais compreende pelo menos um radical de, ou, pelo menos, sobrepõe-se parcialmente com, YLDFQ nas posições de 226 a 230 da SEQ ID NO: 206. Detalhes de um método vantajoso de varredura de ligação de peptídeo para determinar a liquefação são indicados detalhadamente em outra parte desta descrição. Outros métodos que são bem conhecidos na arte e que poderiam ser usados para determinar os radicais ligados por um anticorpo, e/ou para confirmar resultados de varredura de ligação de peptídeo (p. ex. PEPSCAN), incluem mutagênese dirigida para sítio, troca de hidrogênio deutério, espectrometria de massa, RMN, e cristalografia de raios-X.

Assim, um elemento de ligação da invenção neutraliza, de preferência, GM-CSFR α . Neutralização significa redução ou inibição da atividade biológica do GM-CSFR α , p. ex. redução ou inibição da ligação do GM-CSF ao GM-CSFR α , ou da sinalização com GM-CSFR α , p. ex. como medido por meio de respostas mediadas com GM-CSFR α . A redução ou inibição da atividade biológica pode ser parcial ou total. O grau em que um anticorpo neutraliza o GM-CSFR α é referido como sua potência de neutralização. A potência pode ser determinada ou medida usando-se um ou mais ensaios conhecidos pela pessoa versada e/ou como descrito ou referido aqui. Por exemplo, o elemento de ligação pode apresentar atividade

neutralizadora em um ou mais dos seguintes ensaios:

- Ensaio bioquímico de ligação de ligante
- Ensaio de proliferação de TF-1
- Ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos
- 5 • Ensaio de alteração de forma de granulócitos de primatas não-humanos cynomolgus
- Ensaio de liberação de $\text{TNF}\alpha$ de monócitos
- Ensaio de sobrevivência de granulócitos
- Ensaio de formação de colônias (inibição de diferenciação
- 10 *in vitro* mediada com GM-CSF de progenitores de células sanguíneas)
- Inibição da bioatividade de GM-CSF *in vivo*, p. ex. em camundongos quiméricos com medula óssea transgênica expressando GM-CSFR humano
- Ensaio de liberação de citocinas de células mononucleares
- 15 do sangue periférico

A potência é expressa normalmente como um valor IC_{50} , em pM exceto se indicado de outra forma. Em ensaios funcionais, a IC_{50} é a concentração que reduz uma resposta biológica em 50% de sua máxima. Em estudos de ligação de ligante, a IC_{50} é a concentração que reduz a ligação de

20 receptor em 50% do nível máximo de ligação específica. A IC_{50} pode ser calculada plotando-se o % máximo da resposta biológica (representado, p. ex., pela proliferação de células, que pode ser medida como incorporação de ^3H timidina em cpm, em um ensaio de proliferação, pela alteração de forma em um ensaio de alteração de forma, por meio de liberação de $\text{TNF}\alpha$ em um

25 ensaio de liberação de $\text{TNF}\alpha$, por meio de sobrevivência em um ensaio de sobrevivência, pelo número de colônias em um ensaio de formação de colônias, ou pelo aumento do peso do baço ou pela diminuição dos monócitos circulantes em camundongos quiméricos com medula óssea transgênica expressando GM-CSFR humano em um teste de bioatividade) ou % de

ligação de receptor específico como uma função do log da concentração do elemento de ligação, e usando um programa de *software*, como Prism (GraphPad) para adequar-se uma função sigmoideal aos dados para gerar valores IC50.

- 5 Um valor IC50 pode representar a média de uma pluralidade de medições. Assim, por exemplo, valores de IC50 podem ser obtidos dos resultados de experimentos em triplicata, e, então, é possível calcular um valor de IC50 médio.

No ensaio de proliferação de TF-1, elementos de ligação da invenção apresentam normalmente uma IC50 inferior a 1500 pM. Por exemplo, a IC50 pode ser < 300, < 60, < 10, ou < 1,5 pM, p. ex. de cerca de 1,0 pM. Normalmente, a IC50 é de pelo menos 0,5 ou 1,0 nM. O anticorpo murino conhecido 2B7 apresentou uma IC50 de cerca de 1600 pM neste ensaio. O ensaio de proliferação de TF-1 aqui usado foi com uma
10 concentração final de 7 pM de GM-CSF humano. Assim, a potência de neutralização IC50 no ensaio de proliferação de TF-1 representa a capacidade de um elemento de ligação em inibir a proliferação de células TF-1 induzida por 7 pM de GM-CSF humano. Para mais detalhes, ver a seção de Métodos de Ensaio e Materiais.

- 20 Um elemento de ligação da invenção pode apresentar uma pA_2 mais negativa do que -6, -7, -8, -9, -10, -10,5 ou -11 no ensaio de proliferação de TF-1. Por exemplo, pA_2 pode ser de cerca de -10,5 ou -11. O cálculo e a significância de valores de pA_2 são discutidos detalhadamente na Parte Experimental sob Métodos de Ensaio e Materiais.

- 25 No ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos, elementos de ligação da invenção normalmente apresentam uma IC50 inferior a 100 pM, p. ex. inferior a 50 pM ou inferior a 30, 25, 20, 15 ou 10 pM. Normalmente a IC50 é de pelo menos 5, 6 ou 7 pM. Em contraste, o anticorpo murino conhecido 2B7 é menos potente com uma IC50 medida de 477 pM

neste ensaio. O ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos usado aqui foi com uma concentração final de 7 pM de GM-CSF humano. Assim, a potência de neutralização IC₅₀ no ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos representa a capacidade de um elemento de ligação em
5 inibir a alteração de forma de granulócitos humanos induzida por 7 pM de GM-CSF humano. Para maiores detalhes, ver a seção de Métodos de Ensaio e Materiais.

No ensaio de alteração de forma de granulócitos de cynomolgus, elementos de ligação da invenção normalmente apresentam uma
10 IC₅₀ inferior a 20 pM, tipicamente inferior a 10, 5 ou 2,5 pM. A IC₅₀ pode ser de, pelo menos, 0,5, 1 ou 1,5 pM. O anticorpo murino conhecido 2B7 apresentou uma IC₅₀ de 26 pM quando testado neste ensaio. O ensaio de alteração de forma de granulócitos de cynomolgus usado aqui foi com uma concentração final de 7 pM de GM-CSF humano. Assim, a potência de
15 neutralização IC₅₀ no ensaio de alteração de forma de granulócitos de cynomolgus representa a capacidade de um elemento de ligação em inibir a alteração de forma de granulócitos de cynomolgus induzida por 7 pM de GM-CSF humano. Para maiores detalhes, ver a seção de Métodos de Ensaio e Materiais.

20 Um elemento de ligação da invenção pode apresentar uma pA₂ mais negativo do que -6, -7, -8, -9, -10, -10,5 ou -11 no ensaio de alteração de forma de humano e/ou de cynomologus. De preferência, a pA₂ é de cerca de -10 ou -11.

No ensaio de liberação de TNF α de monócitos, elementos de
25 ligação da invenção normalmente apresentam uma IC₅₀ inferior a 150 pM, tipicamente inferior a 110 pM, p. ex. inferior a 100pM. A IC₅₀ pode ser de, pelo menos, 30 ou 40 pM. O ensaio de liberação de TNF α de monócitos usado aqui foi com uma concentração final de 1 nM de GM-CSF humano. Assim, a potência de neutralização IC₅₀ no ensaio de liberação de TNF α de monócitos

representa a capacidade de um elemento de ligação em inibir a liberação de TNF α de monócitos humanos estimulada com 1 nM de GM-CSF humano. Para maiores detalhes, ver a seção de Métodos de Ensaio e Materiais.

No ensaio de sobrevida de granulócitos, elementos de ligação da invenção normalmente apresentam uma IC₅₀ inferior a 1000pM, tipicamente inferior a 850 pM. A IC₅₀ pode ser inferior a 500, 250, 150, 100, 50, 30, 20 ou 10 pM. A IC₅₀ pode ser de pelo menos 5 pM. O anticorpo murino conhecido 2B7 é inativo neste ensaio até uma concentração de 83 nM. O ensaio de sobrevida de granulócitos usado aqui foi com uma concentração final de 7 pM de GM-CSF humano. Assim, potência de neutralização IC₅₀ no ensaio de sobrevida de granulócitos representa a capacidade de um elemento de ligação em inibir a sobrevida de granulócitos humanos induzida com 7 pM de GM-CSF humano. Para maiores detalhes, ver a seção de Métodos de Ensaio e Materiais.

No ensaio de formação de colônias, elementos de ligação da invenção podem apresentar uma IC₅₀ inferior a 5, inferior a 2,5, inferior a 1 ou inferior a 0,3 μ g/ml. De preferência, a IC₅₀ é de 0,25 μ g/ml ou menos, p. ex. inferior a 0,1 μ g/ml. A IC₅₀ pode ser de pelo menos 0,05 μ g/ml. O anticorpo murino conhecido 2B7 apresenta pouca ou nenhuma atividade neste ensaio até uma concentração de 10 μ g/ml (67nM). O ensaio de formação de colônias usado aqui foi com uma concentração final de 10 ng/ml de GM-CSF humano. Assim, a potência de neutralização IC₅₀ no ensaio de formação de colônias representa a capacidade de um elemento de ligação em inibir formação de colônias induzida com 10 ng/ml de GM-CSF humano. Para maiores detalhes, ver a seção de Métodos de Ensaio e Materiais.

Um elemento de ligação da invenção pode apresentar uma capacidade dependente da dose para inibir aumento do peso do baço e/ou inibir uma diminuição induzida com GM-CSF em monócitos circulantes em camundongos quiméricos com medula óssea transgênica expressando GM-

CSFR humano, que são tratados com GM-CSF humano. A IC50 para inibição do aumento do peso do baço pode ser inferior a 5, inferior a 2,5, inferior a 2, inferior a 1 ou inferior a 0,75 mg/kg. A IC50 pode ser de, pelo menos, 0,5 mg/kg em algumas concretizações.

5 Adicionalmente, determinou-se a cinética de ligação e de afinidade de elementos de ligação por GM-CSFR α humano, por exemplo, por meio de ressonância de plasmon de superfície, p. ex. usando BIAcore. Elementos de ligação da invenção normalmente apresenta uma KD inferior a 5 nM e, mais preferivelmente, inferior a 4, 3, 2 ou 1 nM. De preferência, KD é
10 inferior a 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ou 0,15 nM.

 Elementos de ligação da invenção normalmente ligam-se a GM-CSFR α de primata não-humano, p. ex. GM-CSFR α de cynomologus adicionalmente ao GM-CSFR α humano. Como há uma baixa homologia entre receptor de GM-CSF humano e murino (aproximadamente 36%), elementos
15 de ligação da invenção geralmente não se ligarão ou reagirão de maneira cruzada com o receptor murino.

 Normalmente um elemento de ligação da invenção compreende uma molécula de anticorpo, p. ex. um anticorpo inteiro ou fragmento de anticorpo, como discutido mais detalhadamente abaixo. De
20 preferência, uma molécula de anticorpo da invenção é uma molécula de anticorpo humano.

 Um elemento de ligação da invenção compreende normalmente um domínio VH e/ou VL de anticorpo. Domínios VH e domínios VL de elementos de ligação também são proporcionados como parte
25 da invenção. Dentro de cada um dos domínios VH e VL encontram-se regiões determinadoras de complementaridade ("CDRs"), e regiões de estrutura ("FRs"). Um domínio VH compreende um conjunto de HCDRs e um domínio VL compreende um conjunto de LCDRs. Uma molécula de anticorpo compreende tipicamente um domínio VH de anticorpo compreendendo uma

VH de CDR1, CDR2 e CDR3 e uma estrutura. Ela também compreende alternativamente, ou adicionalmente, um domínio VL de anticorpo compreendendo uma VL de CDR1 VL, CDR2 e CDR3 e a estrutura. Uma estrutura de domínio VH ou VL compreende quatro regiões de estrutura, FR1, 5 FR2, FR3 e FR4, interdispersadas com CDRs na estrutura a seguir:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4.

Exemplos de domínios VH e VL de anticorpos, FRs e CDRs de acordo com a presente invenção são como listados na listagem de seqüências anexa que integra a presente descrição. Todas as seqüências VH e VL, seqüências de CDR, conjuntos de CDRs e conjuntos de HCDRs e 10 conjuntos de LCDRs aqui revelados representam aspectos e concretizações da invenção. Assim, um aspecto da invenção é um domínio VH de um elemento de ligação de acordo com a invenção. Um "conjunto de CDRs" compreende CDR1, CDR2 e CDR3. Assim, um conjunto de HCDRs significa HCDR1, HCDR2 e HCDR3, e um conjunto de LCDRs significa LCDR1, LCDR2 e 15 LCDR3. Exceto se indicado de outra forma, um "conjunto de CDRs" inclui HCDRs e LCDRs. Tipicamente, elementos de ligação da invenção são anticorpos monoclonais (mAb).

Como descrito mais detalhadamente na Parte Experimental, nós identificamos um conjunto de moléculas de anticorpos que se ligam a 20 GM-CSFR α . Nós também identificamos determinados radicais nas regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) dos domínios VH e VL que são particularmente importantes para ligação de receptor e potência de neutralização. Como as CDRs são primariamente responsáveis para determinar a ligação e a especificidade de um elemento de ligação, sendo 25 que é possível usar uma ou mais CDRs apresentam os radicais apropriados, como definido aqui, como definido aqui, e incorporadas em qualquer estrutura vantajosa, por exemplo, uma estrutura de domínio VH e/ou VL de anticorpo, ou uma estrutura de suporte de proteína não-anticorpo, como descrito mais

detalhadamente alhures aqui. Por exemplo, uma ou mais CDRs ou um conjunto de CDRs de um anticorpo podem ser enxertadas em uma estrutura (p. ex. estrutura humana) dando uma molécula de anticorpo ou diferentes moléculas de anticorpos. Por exemplo, uma molécula de anticorpo pode compreender CDRs como revelado aqui e regiões de estrutura de seqüências de segmento de gene de linhagem germinal humana. É possível proporcionar um anticorpo com um conjunto de CDRs em uma estrutura que pode ser sujeita a terapia na linhagem germinal, onde um ou mais radicais na estrutura são alterados para equiparar-se aos radicais na posição equivalente na estrutura de linhagem germinal humana mais similar. Assim, regiões de estrutura de anticorpos são, de preferência, de linhagens germinativas e/ou humanas.

Foi realizada uma investigação em que radicais de um anticorpo candidato foram importantes para o reconhecimento de antígenos, de acordo com o método apresentado na seção experimental, e, então, realizamos análise de seqüências de 160 clones apresentando uma potência pelo menos 5 vezes maiores do que o clone de anticorpo parental em um ensaio biológico. Os resultados indicaram as posições a seguir como contribuindo para a ligação de antígenos: radicais Kabat 27A, 27B, 27C, 32, 51, 52, 53, 90, 92 e 96 no domínio VL e radicais Kabat 17, 34, 54, 57, 95, 97, 99 e 100B no domínio VH. Nas concretizações preferidas da invenção, um ou mais destes radicais Kabat é/são os radicais Kabat presentes na posição para um ou mais dos clones de anticorpos enumerados 1, 2 e de 4 a 20 cujas seqüências são reveladas na listagem de seqüências anexa. Em várias concretizações, o radical pode ser igual, ou pode diferir, do radical presente na posição no anticorpo 3.

Nossa análise indicou 4 posições de radicais nas CDRs que apresentam uma influência particularmente forte sobre a ligação do receptor: H97, H100B, L90 e L92 (numeração Kabat). de preferência, H97 de CDR3

VH é S. O radical serina nesta posição foi observado em todos os 160 clones e representam, portanto, um importante radical para reconhecimento de antígeno.

De preferência, uma CDR3 VH compreende um ou mais dos seguintes radicais:

V, N, A ou L no radical Kabat H95, da forma mais preferível, V;

S, F, H, P, T ou W no radical Kabat H99, da forma mais preferível, S;

10 A, T, P, S, V ou H no radical Kabat H100B, da forma mais preferível, A ou T.

De preferência, radical Kabat H34 na CDR1 VH é I. De preferência, CDR2 VH compreende E no radical Kabat H54 e/ou I no radical Kabat H57.

15 Onde o elemento de ligação compreende um domínio VH de anticorpo, radical Kabat H17 na estrutura de domínio VH é, de preferência, S. O radical Kabat H94 é, de preferência, I ou uma substituição conservativa do mesmo (p. ex. L, V, A ou M). Normalmente H94 é I.

De preferência, uma CDR3 VL compreende um ou mais dos seguintes radicais:

S, T ou M no radical Kabat L90, da forma mais preferível, S ou T;

D, E, Q, S, M ou T no radical Kabat L92, da forma mais preferível, D ou E;

25 A, P, S, T, I, L, M ou V no radical Kabat L96, da forma mais preferível, S, P, I ou V, particularmente S.

Radical Kabat L95A na CDR3 VL é, de preferência, S.

De preferência, uma CDR1 VL compreende um ou mais dos seguintes radicais:

S no radical Kabat 27A;

N no radical Kabat 27B;

I no radical Kabat 27C;

D no radical Kabat 32,

5 De preferência, uma CDR2 VL compreende um ou mais dos seguintes radicais:

N no radical Kabat 51;

N no radical Kabat 52;

K no radical Kabat 53.

10 Em uma concretização preferida, um elemento de ligação da invenção compreende uma ou mais CDRs selecionadas dentre CDRS VH e VL, i.e. uma CDR1 VH, 2 e/ou 3 e/ou uma VL de CDR 1, 2 e/ou 3 de qualquer um dos anticorpos 1, 2 ou de 4 a 20 como mostrado na listagem de seqüências, ou do presente anticorpo 3. Em uma concretização preferida, um
 15 elemento de ligação da invenção compreende uma CDR3 VH de qualquer uma das moléculas de anticorpos a seguir: Anticorpo 1 (SEQ ID NO 5); Anticorpo 2 (SEQ ID NO 15); Anticorpo 3 (SEQ ID NO 25); Anticorpo 4 (SEQ ID NO 35); Anticorpo 5 (SEQ ID NO 45); Anticorpo 6 (SEQ ID NO 55); Anticorpo 7 (SEQ ID NO 65); Anticorpo 8 (SEQ ID NO 75); Anticorpo
 20 9 (SEQ ID NO 85); Anticorpo 10 (SEQ ID NO 95); Anticorpo 11 (SEQ ID NO 105); Anticorpo 12 (SEQ ID NO 115); Anticorpo 13 (SEQ ID NO 125); Anticorpo 14 (SEQ ID NO 135); Anticorpo 15 (SEQ ID NO 145); Anticorpo 16 (SEQ ID NO 155); Anticorpo 17 (SEQ ID NO 165); Anticorpo 18 (SEQ ID NO 175); Anticorpo 19 (SEQ ID NO 185); Anticorpo 20 (SEQ ID NO
 25 195). De preferência, o elemento de ligação compreende adicionalmente uma CDR1 VH da SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 173 e/ou uma CDR2 VH da SEQ ID NO: 4. De preferência, um elemento de ligação compreendendo CDR3 VH da SEQ ID NO: 175 compreende uma CDR1 VH da SEQ ID NO: 173, mas pode compreender alternativamente uma CDR1 VH da SEQ ID NO:

3.

De preferência, o elemento de ligação compreende um conjunto de CDRs VH de um dos seguintes anticorpos: Anticorpo 1 (Seq ID 3-5); Anticorpo 2 (SEQ ID 13-15); Anticorpo 3 (SEQ ID 23-25); Anticorpo 4 (SEQ ID 33-35); Anticorpo 5 (SEQ ID 43-45); Anticorpo 6 (SEQ ID 53-55); Anticorpo 7 (SEQ ID 63-65); Anticorpo 8 (SEQ ID 73-75); Anticorpo 9 (SEQ ID 83-85); Anticorpo 10 (SEQ ID 93-95); Anticorpo 11 (SEQ ID 103-105); Anticorpo 12 (SEQ ID 113-115); Anticorpo 13 (SEQ ID 123-125); Anticorpo 14 (SEQ ID 133-135); Anticorpo 15 (SEQ ID 143-145); Anticorpo 16 (SEQ ID 153-155); Anticorpo 17 (SEQ ID 163-165); Anticorpo 18 (SEQ ID 173-175); Anticorpo 19 (SEQ ID 183-185); Anticorpo 20 (SEQ ID 193-195). Opcionalmente ele também pode compreender um conjunto de CDRs VL de um destes anticorpos, e as CDRs VL podem ser do mesmo anticorpo ou de um anticorpo diferente relativamente às CDRs VH. De uma maneira geral, um domínio VH é pareado com um domínio VL para proporcionar um sítio de ligação de antígeno de anticorpo, embora, em algumas concretizações, seja possível usar um domínio VH ou VL sozinho para ligar antígeno. A promiscuidade de cadeia leve é bem estabelecida na arte, e, assim, o domínio VH e VL não precisa ser do mesmo clone como discutido aqui.

Um elemento de ligação pode compreender um conjunto de CDRs H e/ou L de qualquer um dos anticorpos de 1 a 20 com uma ou mais substituições, por exemplo, dez ou menos, p. ex. uma, duas, três, quatro ou cinco, substituições no conjunto de CDRs H e/ou L revelado. Substituições preferidas não são radicais Kabat diferentes de radicais Kabat 27A, 27B, 27C, 32, 51, 52, 53, 90, 92 e 96 no domínio VL, e radicais Kabat 34, 54, 57, 95, 97, 99 e 100B no domínio VH. Onde se realiza substituições nestas posições, a substituição é, de preferência, para um radical indicado aqui como sendo um radical preferido naquela posição.

Em uma concretização preferida, um elemento de ligação da

invenção é uma molécula de anticorpo humana isolada apresentando um domínio VH compreendendo um conjunto de HCDRs em uma estrutura de linhagem germinal humana, p. ex. estrutura de linhagem germinal humana da família de cadeia pesada VH1 ou VH3. Em uma concretização preferida, uma

5 molécula de anticorpo humana isolada tem um domínio VH compreendendo um conjunto de HCDRs em uma estrutura de linhagem germinal humana VH1 DP5 ou VH3 DP47. Assim, as regiões de estrutura de domínio VH podem compreender regiões de estrutura de segmento de gene de linhagem germinal humana VH1 DP5 ou VH3 DP47. A seqüência de aminoácidos de

10 VH FR1 pode ser SEQ ID NO: 251. A seqüência de aminoácidos de VH FR2 pode ser SEQ ID NO: 252. A seqüência de aminoácidos de VH FR3 pode ser SEQ ID NO: 253. A seqüência de aminoácidos de VH FR4 pode ser SEQ ID NO: 254.

Normalmente o elemento de ligação também apresenta um

15 domínio VL compreendendo um conjunto de LCDRs, de preferência, em uma estrutura de linhagem germinal humana, p. ex. uma estrutura de linhagem germinal humana da família de cadeia leve VLambda 1 ou VLambda 6. Em uma concretização preferida, a molécula de anticorpo humana isolada tem um domínio VL compreendendo um conjunto de LCDRs em uma estrutura de

20 linhagem germinal humana VLambda 1 DPL8 ou VLambda 1 DPL3 ou VLambda 6_6a. Assim, a estrutura de domínio VL pode compreender regiões de estrutura de segmento de gene de linhagem germinal humana VLambda 1 DPL8, VLambda 1 DPL3 ou VLambda 6_6a. O domínio VL FR4 pode compreender uma região de estrutura de segmento de gene de linhagem

25 germinal humana JL2. A seqüência de aminoácidos de VL FR1 pode ser SEQ ID NO: 255. A seqüência de aminoácidos de VL FR2 pode ser SEQ ID NO: 256. A seqüência de aminoácidos de VL FR3 pode ser 257. A seqüência de aminoácidos de VL FR4 pode ser SEQ ID NO: 258.

Um anticorpo não-linhagem germinal tem as mesmas CDRs,

porém estruturas diferentes, em comparação com um anticorpo de linhagem germinal.

Um elemento de ligação da invenção pode competir pela ligação a GM-CSFR α com qualquer elemento de ligação revelado aqui, p. ex. anticorpo 3 ou qualquer um dos anticorpos 1, 2 ou de 4 a 20. Assim, um elemento de ligação pode competir pela ligação a GM-CSFR α com uma molécula de anticorpo compreendendo o domínio VH e domínio VL de qualquer um dos anticorpos 1, 2 ou de 4 a 20. A competição entre elementos de ligação pode ser analisada facilmente *in vitro*, por exemplo, por meio de marcação de uma molécula repórter a um elemento de ligação que pode ser detectada na presença de um ou mais outros elementos de ligação não marcados, para permitir a identificação de elementos de ligação que se ligam ao mesmo epitopo ou um epitopo de sobreposição.

A competição pode ser determinada, por exemplo, usando ELISA em que, p. ex., o domínio extracelular de GM-CSFR α , ou um peptídeo do domínio extracelular, é imobilizado em uma placa, e adiciona-se à placa um primeiro elemento de ligação marcado juntamente com um ou mais outros elementos de ligação não marcados. Observa-se a presença de um elemento de ligação não marcado que compete com o elemento de ligação marcado, por meio de uma diminuição do sinal emitido pelo elemento de ligação marcado. De maneira análoga, é possível usar um ensaio de ressonância de plasmon de superfície para determinar a competição entre elementos de ligação.

Em testes para a determinação de competição pode-se empregar um fragmento de peptídeo do antígeno, particularmente um peptídeo incluindo ou consistindo essencialmente de um epitopo ou região de ligação de interesse. É possível usar um peptídeo apresentando o epitopo ou seqüência-alvo mais um ou mais aminoácidos em qualquer ponta. Elementos de ligação de acordo com a presente invenção podem ser tais que sua ligação

com antígeno é inibida por um peptídeo com, ou incluindo, a sequência dada.

Elementos de ligação que se ligam a um peptídeo podem ser isolados, por exemplo, de uma biblioteca de apresentação de fago mediante investigação com o(s) peptídeo(s).

5 A presente invenção também proporciona o uso de um elemento de ligação como acima para a medição dos níveis de antígeno em um ensaio de competição, ou seja, um método de medir o nível de antígeno em uma amostra mediante o emprego de um elemento de ligação como proporcionado pela presente invenção em um ensaio de competição. Isto pode
10 ocorrer onde a separação física de antígeno ligado de antígeno não ligado não é necessária. A ligação de uma molécula repórter ao elemento de ligação de forma que venha a ocorrer uma alteração física ou óptica quando da ligação, é uma possibilidade. A molécula repórter pode gerar diretamente ou indiretamente sinais detectáveis e, de preferência, mensuráveis. A ligação de
15 moléculas-repórter pode ser direta ou indireta, covalente, por exemplo, via uma ligação de peptídeo ou não-covalente. A ligação via uma ligação peptídica pode ser como um resultado de expressão recombinante de um gene que funde anticorpo codificante e molécula repórter.

 A presente invenção também proporciona níveis de medição
20 de antígeno diretamente, mediante o emprego de um elemento de ligação de acordo com a invenção, por exemplo, em um sistema de biossensor.

 A presente invenção proporciona um método que compreende causar ou permitir a ligação de um elemento de ligação como proporcionado aqui a GM-CSFR α . Referida ligação pode ocorrer *in vivo*, p. ex. após
25 administração de um elemento de ligação, ou ácido nucleico que codifica um elemento de ligação, ou pode ocorrer *in vitro*, por exemplo, em ELISA, Western blot, imunoquímica, imunoprecipitação, cromatografia de afinidade, ou ensaios à base de células, como um ensaio de TF-1.

 É possível determinar a quantidade de ligação de elemento de

ligação a GM-CSFR α . A quantificação pode ser relacionada com a quantidade do antígeno em uma amostra de teste, que pode ser de interesse diagnóstico ou prognóstico.

Um kit compreendendo um elemento de ligação ou molécula de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou concretização da presente invenção também é proporcionado como um aspecto da presente invenção. Em um kit da invenção, o elemento de ligação ou molécula de anticorpo pode ser marcado para permitir sua reatividade em uma amostra a ser determinada, p. ex. como descrito adicionalmente abaixo. Componentes de um kit são geralmente estéreis e encontram-se em frascos ou outros recipientes fechados hermeticamente. Kits podem ser empregados em análise diagnóstica ou outros métodos para os quais são úteis moléculas de anticorpos. Um kit pode conter instruções para uso dos componentes em um método, p. ex. um método de acordo com a presente invenção. É possível incluir, em um kit da invenção, materiais ancilares para auxiliar ou permitir a realização de um método do tipo referido.

As reatividades de anticorpos em uma amostra podem ser determinadas via qualquer meio apropriado. Ensaio rádio-imunológico (RIA) é uma possibilidade. Antígeno marcado radiativo é misturado com antígeno não-marcado (a amostra de teste) e deixado ligar-se ao anticorpo. Antígeno ligado é separado fisicamente de antígeno não ligado, e determina-se a quantidade de antígeno radiativo ligado ao anticorpo. Quanto mais antígeno há na amostra de teste, tanto menos antígeno radioativo se ligará ao anticorpo. Também é possível usar um ensaio de ligação competitiva com antígeno não-radioativo, usando antígeno ou um análogo ligado a uma molécula repórter. A molécula repórter pode ser um fluorocromo, corante de fósforo ou a laser com características de absorção ou emissão isoladas espectralmente. Fluorocromos vantajosos incluem fluoresceína, rodamina, ficoeritrina e vermelhos Texas Red. Corantes cromogênicos vantajosos incluem diaminobenzidina. Outros

repórteres incluem partículas coloidais macromoleculares ou material particulado, como pérolas de látex que são coloridas, magnéticas ou paramagnéticas, e agentes biologicamente ou quimicamente ativos que podem causar diretamente ou indiretamente sinais detectáveis possíveis de serem observados visualmente, detectados eletronicamente ou registrados de outra forma. Estas moléculas podem ser enzimas, que catalisam reações que se desenvolvem, ou alteram cores ou causam alterações nas propriedades elétricas, por exemplo. Elas podem ser excitáveis molecularmente, de tal forma que transições eletrônicas entre estados de energia resultem em absorções ou emissões espectrais características. Elas podem incluir entidades químicas usadas em conjunto com biossensores. É possível empregar sistemas de detecção de biotina/avidina ou biotina/estreptavidina e fosfatase alcalina.

Os sinais gerados por conjugados anticorpo-repórter individuais podem ser usados para derivar dados absolutos ou relativos quantificáveis para ligação de anticorpo relevante em amostras (normal e teste).

Em aspectos adicionais, a invenção proporciona um ácido nucleico isolado que compreende uma sequência que codifica um elemento de ligação, domínio VH e/ou domínio VL de acordo com a presente invenção. Ácido nucleico pode incluir DNA e/ou RNA, e pode ser totalmente ou parcialmente sintético. Referência a uma sequência de nucleotídeos como apresentada aqui compreende uma molécula de DNA com a sequência especificada, e compreende uma molécula de RNA com a sequência especificada em que U é substituído por T, exceto se o contexto o exigir de outra forma. Em um aspecto preferido, a presente invenção proporciona um ácido nucleico que codifica para uma CDR ou conjunto de CDRs ou sítio de ligação de antígeno de anticorpo de domínio VH ou domínio VL, ou molécula de anticorpo, p. ex. scFv ou IgG1 ou IgG4, da invenção como definido aqui. A presente invenção também proporciona construções em forma

de plasmídeos, vetores, cassetes de transcrição ou expressão que compreendem pelo menos um polinucleotídeo como acima.

Um aspecto adicional é uma célula hospedeira transformada com ou contendo ácido nucleico da invenção. Uma célula hospedeira do tipo referido pode ser *in vitro* e pode ser em cultura. Uma célula hospedeira do tipo referido pode ser *in vivo*. A presença *in vivo* da célula hospedeira pode permitir a expressão intracelular dos elementos de ligação da presente invenção como “intracorpos” ou intracelular anticorpos. Intracorpos podem ser usados para terapia gênica.

Um outro aspecto adicional proporciona um método que compreende introduzir referido ácido nucleico em uma célula hospedeira. A introdução pode empregar qualquer técnica vantajosa. No caso de células eucarióticas, técnicas vantajosas podem incluir transfecção de fosfato de cálcio, transfecção de fosfato de cálcio, DEAE-dextrano, eletroporação, transfecção mediada com lipossomas e transdução usando retrovírus ou outro vírus, p. ex. *vaccinia* ou, no caso de células de inseto, baculovírus. A introdução de ácido nucleico na célula hospedeira, em particular uma célula eucariótica, pode usar um sistema viral ou baseado em plasmídeo. O sistema de plasmídeo pode ser mantido episomicamente ou pode ser incorporado na célula hospedeira ou em um cromossomo artificial. A incorporação pode ser via integração randômica ou objetivada de uma ou mais cópias em *loci* simples ou múltiplos. No caso de células bacterianas, técnicas vantajosas podem incluir transformação de cloreto de cálcio, eletroporação e transfecção usando bacteriófagos.

A introdução pode ser seguida causando ou permitindo expressão do ácido nucleico, p. ex. cultivando-se células hospedeiras em condições para expressão do gene.

Em uma concretização, o ácido nucleico da invenção é integrado no genoma (p. ex. cromossoma) da célula hospedeira. A integração

pode ser promovida por meio de inclusão de seqüências que promovem a recombinação com o genoma, de acordo com técnicas convencionais.

A presente invenção também proporciona um método que compreende usar uma construção como indicada acima em um sistema de expressão para expressar um elemento de ligação ou polipeptídeo como
5 acima. Assim, métodos de preparar um elemento de ligação, um domínio VH e/ou um domínio VL da invenção, são aspectos adicionais da invenção. Um método pode compreender expressar referido ácido nucleico em condições tais a proporcionar a produção de referido elemento de ligação, domínio VH e/ou
10 domínio VL, e recuperar o mesmo. Um método do tipo referido pode compreender cultivar células hospedeiras em condições para a produção de referido elemento de ligação ou domínio de anticorpo.

Um método de produção pode compreender uma etapa de isolamento e/ou purificação do produto. Um método de produção pode
15 compreender formular o produto em uma composição incluindo pelo menos um componente adicional, como um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Sistemas para a clonagem e expressão de um polipeptídeo numa variedade de células hospedeiras diferentes, são bem conhecidos. Células hospedeiras vantajosas incluem bactérias, células mamíferas, células
20 de plantas, sistemas de leveduras e baculovírus e animais e plantas transgênicas. A expressão de anticorpos e fragmentos de anticorpos em células procarióticas é bem estabelecida na arte [3]. Um hospedeiro bacteriano comum, preferido, é *E. coli*.

A expressão em células eucarióticas em cultura também pode
25 ser obtida por aqueles com prática na arte, como uma opção para a produção de um elemento de ligação [4,5,6]. Linhagens de células mamíferas disponíveis na arte para expressão de um polipeptídeo heterólogo incluem células de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, células de rim de bebê de hamster, células de melanoma de camundongo NS0, células de

mieloma de rato YB2/0, células de rim embrionário humano, células de retina embrionária humana, e muitas outras.

Vetores vantajosos podem ser selecionados ou construídos, contendo seqüências reguladoras apropriadas, incluindo seqüências
5 promotoras, seqüências terminadoras, seqüências de poliadenilação, seqüências acentuadoras, genes marcadores e outras seqüências, conforme apropriado. Vetores podem consistir de plasmídeos, p. ex., fagomídeos, ou podem ser virais, p. ex., 'fago, conforme apropriado [7]. Muitas técnicas e protocolos conhecidos para a manipulação de ácido nucleico, por exemplo, na
10 preparação de construções de ácido nucleico, mutagênese, seqüenciamento, introdução de DNA em células e expressão gênica, e análise de proteínas, encontram-se descritas detalhadamente em Ausubel *et al.* [8].

A presente invenção proporciona um método de obter um ou mais elementos de ligação capazes de ligar-se ao antígeno, sendo que o
15 método inclui contatar uma biblioteca de elementos de ligação de acordo com a invenção e referido antígeno, e selecionar um ou mais elementos de ligação da biblioteca capazes de se ligarem a referido antígeno.

A biblioteca pode ser aplicada em partículas ou complexos moleculares, p. ex. pacotes genéticos replicáveis, como levedura, partículas
20 bacterianas ou bacteriófagos (p. ex. T7), ou sistemas covalentes, ribossômicos ou outros sistemas de apresentação *in vitro*, sendo que cada partícula ou complexo molecular contém ácido nucleico que codifica o domínio variável VH do anticorpo apresentado sobre o mesmo, e opcionalmente também um domínio VL apresentado, se presente. A seleção de elementos de ligação
25 capazes de se ligarem ao antígeno e apresentados em bacteriófagos ou outras partículas de biblioteca ou complexos moleculares, ácido nucleico pode ser obtido de um bacteriófago ou de outra partícula ou complexo molecular apresentando um elemento de ligação selecionado. Referido ácido nucleico pode ser usado na produção subsequente de um elemento de ligação ou um

domínio variável VH ou VL de anticorpo por meio de expressão de ácido nucleico com a seqüência de ácido nucleico obtida de um bacteriófago ou outra partícula ou complexo molecular apresentando um referido elemento de ligação selecionado.

5 Um domínio variável VH de anticorpo com a seqüência de aminoácidos de um domínio variável VH de anticorpo de um referido elemento de ligação selecionado pode ser proporcionado em forma isolada, como pode um elemento de ligação compreendendo referido domínio VH.

10 Um domínio variável VL de anticorpo com a seqüência de aminoácidos de um domínio variável VL de anticorpo de um referido elemento de ligação selecionado pode ser proporcionado em forma isolada, como o pode um elemento de ligação compreendendo um domínio VL do tipo referido.

15 A capacidade de ligar-se a GM-CSFR α pode ser testada adicionalmente, também a capacidade de competir por qualquer um dos anticorpos de 1 a 20 (p. ex. em formato scFv e/ou formato IgG, p. ex. IgG1 ou IgG4) para ligação a GM-CSFR α . A capacidade de neutralizar GM-CSFR α pode ser testada.

20 Variantes dos domínios VH e VL e CDRs da presente invenção, incluindo aquelas para as quais seqüências de aminoácidos são apresentadas aqui podem ser obtidas por meio de métodos de alteração ou mutação e seleção de seqüências, e podem ser empregadas em elementos de ligação para GM-CSFR α . Seguindo a orientação da química computacional na aplicação de técnicas de análise de dados multivariados nas relações
25 quantitativas de atividade de propriedade/estrutura [9] de anticorpos podem ser derivadas usando-se técnicas matemáticas bem conhecidas, como regressão estatística, reconhecimento de padrões, e classificação [10,11,12,13,14,15]. As propriedades de anticorpos podem ser derivadas de modelos empíricos e teóricos (por exemplo, análise de radicais de contato

provável ou propriedade físico-química calculada) de seqüência de anticorpos, estruturas funcionais e tridimensionais, e estas propriedades podem ser consideradas singelamente e em combinação.

Um sítio de ligação de antígeno de anticorpo constituído de um domínio VH e um domínio VL é formado por seis alças de polipeptídeo: 5 três do domínio variável de cadeia leve (VL) e três do domínio variável de cadeia pesada (VH). A análise de anticorpos com estrutura atômica conhecida apresenta relações elucidadas entre a seqüência e estrutura tridimensional de sítios de combinação de anticorpo [16,17]. Estas relações implicam que, 10 exceto quanto à terceira região (alça) em domínios VH, alças de sítios de ligação apresentam um de uma de um pequeno número de conformações de cadeia principal: estruturas canônicas. Mostrou-se que a estrutura canônica formada em uma alça particular é determinada por seu tamanho e pela presença de determinados radicais em sítios-chaves tanto nas regiões de alça 15 como nas regiões de estrutura [16,17].

Este estudo de relação seqüência-estrutura pode ser usado para a predição daqueles radicais em um anticorpo de seqüência conhecida, mas com uma estrutura tridimensional desconhecida, que são importantes na manutenção da estrutura tridimensional de suas alças de CDR e, 20 conseqüentemente, conservam a ligação. Estas predições podem ser corroboradas por meio de comparação das predições com os resultados de experimentos de otimização guia [*lead*]. Em uma abordagem estrutural, é possível criar um modelo da molécula de anticorpo [18] usando-se qualquer pacote comercial ou livremente acessível, como WAM [19]. É possível usar 25 então um pacote de programas de análise e visualização de proteínas, como Insight II (Accelerys, Inc.) ou Deep View [20] para avaliar possíveis substituições em cada posição na CDR. Esta informação pode ser usada então para preparar substituições que provavelmente apresentam um efeito mínimo ou benéfico sobre a atividade.

As técnicas requeridas para preparar substituições em seqüências de aminoácidos de CDRs, domínios VH ou VL de anticorpo e elementos de ligação são geralmente disponíveis na arte. É possível preparar seqüências variantes com substituições que podem ou não ser preditas como
5 apresentando um efeito mínimo ou benéfico sobre a atividade, e testadas quanto à capacidade de se ligarem a, e/ou neutralizarem, GM-CSFR α e/ou quanto a qualquer outra propriedade desejada.

Variantes de seqüências de aminoácidos de domínio variável de qualquer um dos domínios VH e VL cujas seqüências são divulgadas aqui
10 especificamente podem ser empregadas de acordo com a presente invenção, como discutido. Variantes particulares podem incluir uma ou mais alterações de seqüências de aminoácidos (adição, deleção, substituição e/ou inserção de um radical de aminoácido), podem apresentar menos de cerca de 20 alterações, menos de cerca de 15 alterações, menos de cerca de 10 alterações ou
15 menos de cerca de 5 alterações, podem ser 5, 4, 3, 2 ou 1. Alterações podem ser preparadas em uma ou mais regiões de estrutura e/ou uma ou mais CDRs.

De preferência, alterações não resultam em perda de função, de modo que um elemento de ligação compreendendo uma seqüência de aminoácido alterada desta forma conserva, de preferência, uma capacidade de
20 ligar-se a, e/ou neutralizar, GM-CSFR α . Mais preferivelmente, ele conserva a mesma capacidade quantitativa de ligação e/ou de neutralização que o elemento de ligação em que a alteração não é realizada, p. ex. conforme medido em um ensaio aqui descrito. Da forma mais preferível, o elemento de ligação compreendendo uma seqüência de aminoácidos assim alterada
25 apresenta uma capacidade incrementada de ligar-se a, ou neutralizar GM-CSFR α em comparação com um elemento de ligação em que a alteração não é realizada, p. ex. conforme medido em um ensaio aqui descrito.

A alteração pode compreender substituir um ou mais radicais de aminoácidos com um aminoácido não convencional ou não naturalmente

ocorrente, modificando um ou mais radicais de aminoácidos em uma forma não convencional ou não naturalmente ocorrente, ou inserindo um ou mais aminoácidos não convencionais ou não naturalmente ocorrentes na seqüência. Números e locais preferidos de alterações em seqüências da invenção encontram-se descritos alhures aqui. Aminoácidos naturalmente ocorrentes incluem os 20 aminoácidos L "convencionais" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E mediante o uso do código convencional de uma letra só. Aminoácidos não convencionais incluem qualquer outro radical que pode ser incorporado em uma espinha dorsal de polipeptídeo ou resultar da modificação de um radical de aminoácido existente. Aminoácidos não convencionais podem ser naturalmente ocorrentes ou não naturalmente ocorrentes. Diversos aminoácidos não convencionais naturalmente ocorrentes são conhecidos na arte, como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metil-histidina, N-acetilserina, etc. [21]. Aqueles radicais de aminoácidos que são derivados em sua posição N-alfa só se encontrarão na ponta N de uma seqüência de aminoácidos. Normalmente, na presente invenção, um aminoácido é um aminoácido L, mas em algumas concretizações, ele pode ser um aminoácido D. A alteração pode compreender, portanto, a modificação de um aminoácido L em um aminoácido D, ou substituição por um aminoácido D. Formas metiladas, acetiladas e/ou fosforiladas de aminoácidos também são conhecidas, e aminoácidos na presente invenção podem ser sujeitos a modificação do tipo referido.

Seqüências de aminoácidos em domínios de anticorpo e elementos de ligação da invenção podem compreender aminoácidos não naturais ou não convencionais descritos acima. Em algumas concretizações é possível incorporar aminoácidos não-convencionais (p. ex. aminoácidos D) em uma seqüência de aminoácidos durante a síntese, enquanto que, em outras concretizações, os aminoácidos não-convencionais podem ser introduzidos

por meio de modificação ou reposição dos aminoácidos convencionais "originais" após a síntese da seqüência de aminoácidos.

O uso de aminoácidos não convencionais e/ou não naturalmente ocorrentes aumenta a diversidade estrutural e funcional, e, portanto, pode aumentar o potencial para se obter as desejadas propriedades de ligação e neutralização de GM-CSFR α em um elemento de ligação da invenção. Adicionalmente, mostrou-se que aminoácidos D e análogos apresentam perfis farmacocinéticos melhores em comparação com aminoácidos L convencionais, em virtude da degradação *in vivo* de polipeptídeos apresentando aminoácidos L após a administração a um animal.

Como indicado acima, uma seqüência de aminoácidos de CDR substancialmente como apresentada aqui é realizada, de preferência, como uma CDR em um domínio variável de anticorpo humano ou uma porção substancial do mesmo. As seqüências de HCDR3 substancialmente como apresentadas aqui representam concretizações preferidas da presente invenção e prefere-se que cada uma destas seja realizada como uma HCDR3 em um domínio variável de cadeia pesada humana ou uma porção substancial da mesma.

Domínios variáveis empregados na invenção podem ser obtidos ou derivados de qualquer linhagem germinal ou domínio variável humano rearranjado, ou podem ser um domínio variável sintético baseado em seqüências consenso ou efetivas de domínios variáveis humanos conhecidos. Uma seqüência de CDR da invenção (p. ex. CDR3) pode ser introduzida em um repertório de domínios variáveis que não apresentam uma CDR (p. ex. CDR3), usando tecnologia de DNA recombinante.

Por exemplo, Marks *et al.* (1992) [22] descrevem métodos de produzir repertórios de domínios variáveis de anticorpos em que iniciadores consenso dirigidos, ou adjacentes, à ponta 5' da área de domínio variável são usados em conjunto com iniciadores consenso para a terceira região de

estrutura de genes de VH humanos para proporcionar um repertório de domínios variáveis VH que não apresentam uma CDR3. Marks *et al.* descrevem adicionalmente como este repertório pode ser combinado com uma CDR3 de um anticorpo particular. Usando-se técnicas análogas, as seqüências derivadas de CDR3 da presente invenção podem ser embaralhadas com repertórios de domínios VH ou VL que não apresentam uma CDR3, e os domínios VH ou VL completos embaralhados combinados com um domínio VH ou VL completo embaralhado, combinado com um domínio VH ou VL cognato para proporcionar elementos de ligação da invenção. Em seguida, o repertório pode ser apresentado em um sistema hospedeiro vantajoso, como o sistema de apresentação de fago do WO92/01047 ou qualquer um de um grande corpo de literatura subsequente, incluindo ref. [23], de forma que é possível selecionar elementos de ligação vantajosos. Um repertório pode consistir de qualquer quantidade, desde 10^4 elementos individuais até mais, por exemplo, de 10^6 a 10^8 ou 10^{10} elementos. Outros sistemas hospedeiros vantajosos incluem apresentação de levedura, apresentação bacteriana, apresentação de T7, apresentação viral, apresentação de células, apresentação de ribossoma e apresentação covalente. Técnicas análogas de embaralhamento ou combinatoriais também são divulgadas por Stemmer (1994)[24], que descreve a técnica com relação a um gene de β -lactamase, mas que observa que a abordagem pode ser usada para a geração de anticorpos.

Uma alternativa adicional consiste em gerar regiões VH ou VL inéditas portando seqüências derivadas de CDR da invenção usando mutagênese randômica de um ou mais genes VH e/ou VL selecionados para gerar mutações em todo o domínio variável. Uma técnica do tipo referido é descrita por Gram *et al.* (1992) [25], que usou PCR propensa a erro. Em concretizações preferidas prepara-se uma ou duas substituições de aminoácidos em um conjunto de HCDRs e/ou LCDRs. Outro método que

pode ser usado consiste em dirigir mutagênese para regiões de CDR de genes VH ou VL [26,27].

Um aspecto adicional da invenção proporciona um método para se obter um sítio de ligação de antígeno de anticorpo para antígeno de GM-CSFR α , sendo que o método compreende proporcionar, como adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na seqüência de aminoácidos de um domínio VH apresentado aqui, um domínio VH que é uma variante de seqüência de aminoácidos do domínio VH, opcionalmente combinando-se o domínio VH assim proporcionado com um ou mais domínios VL, e testando o domínio VH ou combinação ou combinações de VH/VL para identificar um elemento de ligação ou um sítio de ligação de antígeno de anticorpo para antígeno de GM-CSFR α e opcionalmente com uma ou mais propriedades preferidas, de preferência, a capacidade de neutralizar a atividade de GM-CSFR α . Referido domínio VL pode apresentar uma seqüência de aminoácidos que é substancialmente como apresentado aqui.

É possível empregar um método análogo em que uma ou mais variantes de seqüências de um domínio VL aqui divulgado são combinadas com um ou mais domínios VH.

Um aspecto adicional da invenção proporciona um método de preparar um elemento de ligação para antígeno de GM-CSFR α , sendo que referido método compreende:

(a) proporcionar um repertório de partida de ácidos nucleicos codificando um domínio VH que inclui uma CDR3 a ser substituída, ou carecem de uma região codificante de CDR3;

(b) combinar referido repertório com um ácido nucleico doador que codifica uma seqüência de aminoácidos substancialmente como indicada aqui para uma CDR3 VH de tal forma que referido ácido nucleico doador é inserido na região de CDR3 no repertório, de forma a proporcionar

um repertório-produto de ácidos nucleicos codificando um domínio VH;

(c) expressar os ácidos nucleicos de referido repertório-produto;

(d) seleccionar um elemento de ligação para GM-CSFR α ; e

5 (e) recuperar referido elemento de ligação ou ácido nucleico que codifica o mesmo.

Novamente, é possível empregar um método análogo em que uma CDR3 VL da invenção é combinada com um repertório de ácidos nucleicos codificando um domínio VL que inclui uma CDR3 a ser substituída
10 ou não apresenta uma região codificante de CDR3.

De forma análoga, uma ou mais, ou todas as três CDRs podem ser enxertadas em um repertório de domínios VH ou VL que são, então, seleccionados quanto a um elemento de ligação ou elementos de ligação para GM-CSFR α .

15 Em uma concretização preferida, é possível usar um ou mais de HCDR1, HCDR2 e HCDR3, p. ex. um conjunto de HCDRs de Anticorpo 1 (SEQ ID NOS: 3-5); Anticorpo 2 (SEQ ID NOS: 13-15); Anticorpo 4 (SEQ ID NOS: 33-35); Anticorpo 5 (SEQ ID NOS: 43-45); Anticorpo 6 (SEQ ID NOS: 53-55); Anticorpo 7 (SEQ ID NOS: 63-65); Anticorpo 8 (SEQ ID
20 NOS: 73-75); Anticorpo 9 (SEQ ID NOS: 83-85); Anticorpo 10 (SEQ ID NOS: 93-95); Anticorpo 11 (SEQ ID NOS: 103-105); Anticorpo 12 (SEQ ID NOS: 113-115); Anticorpo 13 (SEQ ID NOS: 123-125); Anticorpo 14 (SEQ ID NOS: 133-135); Anticorpo 15 (SEQ ID NOS: 143-145); Anticorpo 16 (SEQ ID NOS: 153-155); Anticorpo 17 (SEQ ID NOS: 163-165); Anticorpo
25 18 (SEQ ID NOS: 173-175); Anticorpo 19 (SEQ ID NOS: 183-185) ou Anticorpo 20 (SEQ ID NOS: 193-195); ou opcionalmente Anticorpo 3 (SEQ ID NOS: 23-25), e/ou é possível usar um ou mais de LCDR1, LCDR2 e LCDR3, p. ex., um conjunto de LCDRs de Anticorpo 1 (SEQ ID NOS: 8-10); Anticorpo 2 (SEQ ID NOS: 18-20); Anticorpo 4 (SEQ ID NOS: 38-40);

Anticorpo 5 (SEQ ID NOS: 48-50); Anticorpo 6 (SEQ ID NOS: 58-60);
Anticorpo 7 (SEQ ID NOS: 68-70); Anticorpo 8 (SEQ ID NOS: 78-80);
Anticorpo 9 (SEQ ID NOS: 88-90); Anticorpo 10 (SEQ ID NOS: 98-100);
Anticorpo 11 (SEQ ID NOS: 108-110); Anticorpo 12 (SEQ ID NOS: 118-
5 120); Anticorpo 13 (SEQ ID NOS: 128-130); Anticorpo 14 (SEQ ID NOS:
138-140); Anticorpo 15 (SEQ ID NOS: 148-150); Anticorpo 16 (SEQ ID
NOS: 158-160); Anticorpo 17 (SEQ ID NOS: 168-170); Anticorpo 18 (SEQ
ID NOS: 178-180); Anticorpo 19 (SEQ ID NOS: 188-190) ou Anticorpo 20
(SEQ ID NOS: 198-200); ou opcionalmente Anticorpo 3 (SEQ ID NOS: 28-
10 30).

Uma porção substancial de um domínio variável de
imunoglobulina compreenderá pelo menos as três regiões de CDR, em
conjunto com suas regiões de estrutura intervenientes. De preferência, a
porção também incluirá pelo menos cerca de 50% de um ou ambos dentre
15 primeira e quarta regiões de estrutura, sendo que 50% são os 50% da ponta C
da primeira região de estrutura e os 50% da ponta N da quarta região de
estrutura. Radicais adicionais na ponta N ou C da parte substancial do
domínio variável podem ser aqueles não associados normalmente com regiões
de domínio variável naturalmente ocorrentes. Por exemplo, a construção de
20 elementos de ligação da presente invenção preparados por meio de técnicas de
DNA recombinante pode resultar na introdução de radicais N- ou C-terminais
codificados por ligantes introduzidos para facilitar a clonagem ou outras
etapas de manipulação. Outras etapas de manipulação incluem a introdução
de ligantes para conjugar domínios variáveis da invenção a seqüências de
25 proteínas adicionais incluindo regiões constantes de anticorpos, outros
domínios variáveis (por exemplo, na produção de diacorpos) ou marcadores
detectáveis/funcionais como discutido mais detalhadamente alhures aqui.

Embora em um aspecto preferido da invenção elementos de
ligação compreendendo um par de domínios VH e VL sejam preferidos,

domínios de ligação simples baseados em seqüências de domínios VH ou VL formam aspectos adicionais da invenção. É de conhecimento geral que domínios de imunoglobulina simples, particularmente domínios VH, são capazes de ligar antígenos-alvo. Por exemplo, ver a discussão de dAbs alhures
5 aqui.

No caso de qualquer um dos domínios de ligação simples, estes domínios podem ser usados para selecionar domínios de complementaridade capazes de formar um elemento de ligação de dois domínios capaz de ligar-se a GM-CSFR α . Isto pode ser obtido por meio de
10 métodos de seleção de apresentação de fago usando-se a assim-chamada abordagem combinatorial hierárquica dupla como revelado no WO92/01047, em que uma colônia individual contendo um clone de cadeia H ou L é usada para infectar uma biblioteca completa de clones codificando a outra cadeia (L ou H) e o resultante elemento de ligação de duas cadeias é selecionado de
15 acordo com técnicas de apresentação de fago, como aquelas descritas naquela referência e [22].

Aspectos adicionais da presente invenção proporcionam composições contendo elementos de ligação da invenção e pelo menos um componente adicional, p. ex. uma composição compreendendo um elemento
20 de ligação e um excipiente farmacologicamente aceitável. Referidas composições podem ser usadas em métodos de inibir ou neutralizar GM-CSFR α , incluindo métodos de tratamento do corpo humano ou animal por meio de terapia.

A invenção proporciona preparações heterogêneas
25 compreendendo moléculas de anticorpos anti-GM-CSFR α . Por exemplo, referidas preparações podem ser misturas de anticorpos com cadeias pesadas de comprimento pleno e cadeias pesadas não apresentando a lisina C-terminal, com vários graus de glicosilação e/ou com aminoácidos derivados, como ciclização de um ácido glutâmico N-terminal para formar um radical de ácido

piroglutâmico.

Aspectos da invenção incluem métodos de tratamento compreendendo a administração de um elemento de ligação como proporcionado, composições farmacêuticas compreendendo um elemento de
5 ligação do tipo referido, e uso de um elemento de ligação do tipo referido na fabricação de uma droga, por exemplo, em um método de preparar uma droga ou composição farmacêutica, compreendendo formular o elemento de ligação com um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Tratamento anti-GM-CSFR α pode ser administrado oralmente
10 (por exemplo, nanocorpos), por meio de injeção (por exemplo, subcutaneamente, intravenosamente, intra-arterialmente, intra-articularmente, intraperitonealmente ou intramuscularmente), por inalação, pela via intravesicular (instilação na bexiga urinária), ou topicamente (por exemplo, intraocular, intranasal, retal, em feridas, sobre a pele). O tratamento pode ser
15 administrado por meio de infusão pulsada, particularmente com doses declinantes de elemento de ligação. A via de administração pode ser determinada pelas características físico-químicas do tratamento, mediante considerações especiais relativas à doença, ou à exigência de otimizar a eficácia ou minimizar efeitos colaterais. Considera-se que tratamento anti-
20 GM-CSFR α não se restringirá ao uso na clínica. Portanto, prefere-se também injeção subcutânea empregando um dispositivo isento de agulha.

Uma composição pode ser administrada sozinho ou em combinação com outros tratamentos, dependentes simultaneamente ou seqüencialmente da condição a ser tratada. É possível usar tratamentos de
25 combinação para proporcionar efeitos sinérgicos significativos, particularmente a combinação de um elemento de ligação anti-GM-CSFR α com uma ou mais outras drogas. Um elemento de ligação de acordo com a presente invenção pode ser proporcionado em combinação ou adição a um ou mais dos seguintes: NSAIDs (p. ex., inibidores de cox, como Celecoxib e

outros inibidores de cox2 similares), corticosteróides (p. ex. prednisona) e drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARDs) p. ex. Humira (adalimumab), metotrexato, Arava, Enbrel (Etanercept), Remicade (Infliximab), Kineret (Anakinra), Rituxan (Rituximab), Orencia (abatacept),
5 sais de ouro, antimaláricos, sulfasalazina d-penicilamina, ciclosporina A, diclofenaco, ciclofosfamida e azatioprina.

De acordo com a presente invenção, composições proporcionadas podem ser administradas a indivíduos. A administração é, de preferência, numa "quantidade terapêuticamente efetiva", sendo que isto é
10 suficiente para apresentar benefício a um paciente. Referido benefício pode ser, pelo menos, o melhoramento de pelo menos um sintoma. A quantidade efetiva administrada, e a taxa e duração da administração, dependerá da natureza e da gravidade do que está sendo tratado. A prescrição do tratamento, p. ex. decisões relativas à dosagem, etc., encontra-se dentro do
15 âmbito da responsabilidade de praticantes gerais e de outros doutores médicos, e pode depender da gravidade dos sintomas e/ou da progressão de uma doença que está sendo tratada. Doses apropriadas de anticorpo são bem conhecidas na arte [28,29]. É possível usar dosagens específicas indicadas aqui, ou na obra *Physician's Desk Reference* (2003) como apropriadas para o
20 tipo de droga sendo administrada. Uma quantidade terapêuticamente efetiva ou dose vantajosa de um elemento de ligação da invenção pode ser determinada comparando-se sua atividade *in vitro* e atividade *in vivo* em um modelo animal. Métodos para extrapolação de dosagens efetivas em camundongos e outros animais de teste para humanos já são conhecidos. A
25 dose precisa dependerá de uma quantidade de fatores, incluindo se o anticorpo é para diagnóstico ou para tratamento, do tamanho e da localização da área a ser tratada, da natureza precisa do anticorpo (p. ex., anticorpo integral, fragmento ou diacorpo), e da natureza de qualquer marcador detectável ou outra molécula ligada ao anticorpo. Uma dose típica de anticorpo situa-se na

faixa de 100 µg a 1 g, no caso de aplicações sistêmicas, e de 1 µg a 1 mg, no caso de aplicações tópicas. Tipicamente, o anticorpo será um anticorpo integral, de preferência, IgG1, IgG2 ou, mais preferivelmente, IgG4. Esta é uma dose para um tratamento único de um paciente adulto, que pode ser

5 ajustada proporcionalmente para crianças e bebês, e também ajustada para outros formatos de anticorpos em proporção ao peso molecular. Os tratamentos podem ser repetidos em intervalos diários, bi-semanais, semanais ou mensais, dependendo do julgamento do médico. Em concretizações preferidas da presente invenção, o tratamento é periódico, e o período entre as

10 administrações é de cerca de duas semanas ou mais, de preferência, de cerca de três semanas ou mais, mais preferivelmente de cerca de quatro semanas ou mais, ou cerca de uma vez por mês. Em outras concretizações preferidas da invenção, o tratamento pode ser dado antes, e/ou após a cirurgia, e, mais preferivelmente, pode ser administrado ou aplicado diretamente no sítio

15 anatômico do tratamento cirúrgico.

Elementos de ligação da presente invenção serão administrados usualmente em forma de uma composição farmacêutica, que pode compreender pelo menos um componente adicionalmente ao elemento de ligação. Assim, composições farmacêuticas de acordo com a presente

20 invenção, e para uso de acordo com a presente invenção, podem compreender, adicionalmente ao ingrediente ativo, um excipiente farmaceuticamente aceitável, veículo, tamponador, estabilizador ou outros materiais farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos por aqueles com prática na arte. Referidos materiais deveriam ser não-tóxicos e não deveriam interferir

25 com a eficácia do ingrediente ativo. A natureza precisa do veículo ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser oral, ou por injeção, p. ex. intravenosa. Composições farmacêuticas para administração oral podem ser forma de tablete, cápsula, pó, líquido ou semi-sólido. Um tablete pode compreender um veículo sólido, como gelatina, ou um adjuvante.

Composições farmacêuticas líquidas compreendem geralmente um veículo líquido, como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. É possível incluir solução salina fisiológica, dextrose ou outra solução de sacarídeos ou glicóis, como etileno glicol, propileno glicol ou polietileno glicol. No caso de injeção intravenosa, ou injeção no sítio de acometimento, o ingrediente ativo estará em forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável que é isenta de pirogênio e que apresenta pH, isotonicidade e estabilidade vantajosas. Aqueles com prática relevante na arte conhecem como preparar soluções vantajosas empregando, por exemplo, veículos isotônicos, como injeção de cloreto de sódio, injeção de Ringer, injeção de Ringer lactada. É possível incluir conservantes, estabilizadores, tamponantes, antioxidantes e/ou outros aditivos, conforme necessário. Elementos de ligação da presente invenção podem ser formulados em formas líquidas, semi-sólidas ou sólidas, dependendo das propriedades físico-químicas da molécula, e da via de fornecimento. Formulações podem incluir excipientes, ou combinações de excipientes, por exemplo: açúcares, aminoácidos e tensoativos. Formulações líquidas podem incluir uma ampla faixa de concentrações de anticorpos e pH. Formulações sólidas podem ser produzidas por meio de liofilização, secagem por pulverização, ou secagem por meio de tecnologia de fluido supercríticos, por exemplo. Formulações de anti-GM-CSFR α dependerão da via de fornecimento desejada: por exemplo, formulações para fornecimento pulmonar podem consistir de partículas com propriedades físicas que asseguram a penetração na parte profunda do pulmão mediante inalação; formulações tópicas podem incluir agentes modificadores de viscosidade, que prolongam o tempo em que a droga permanece no sítio de ação. Em determinadas concretizações, o elemento de ligação pode ser preparado com um veículo que protegerá o elemento de ligação contra liberação rápida, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos, e sistemas de fornecimento

microencapsulados. É possível usar polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, como acetato de vinil etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de referidas formulações são conhecidos por aqueles com prática na arte. Ver, p. 5 ex., Robinson, 1978 [30].

Elementos de ligação de acordo com a invenção podem ser usados em um método de tratamento ou diagnóstico do corpo humano ou animal, como um método de tratamento (que pode incluir tratamento profilático) de uma doença ou desordem em um paciente humano, que 10 compreende administrar a referido paciente uma quantidade efetiva de um elemento de ligação da invenção. Condições tratáveis de acordo com a presente invenção incluem qualquer uma em que GM-CSFR α desempenha um papel. A literatura técnica publicada indica um papel para GM-CSF em vários doenças e condições, como resumido abaixo. Como GM-CSF se liga 15 especificamente a GM-CSFR α , é possível encontrar efeitos patológicos e/ou sintomáticos do GM-CSF mediante a inibição do GM-CSF ao GM-CSFR α . Assim, a evidência publicada, adicionalmente aos dados farmacológicos *in vivo* e *in vitro* apresentados para as moléculas de anticorpos descritas aqui na Parte Experimental, indica que é possível usar elementos de ligação da 20 invenção no tratamento de condições, doenças e desordens autoimunes e/ou inflamatórias, por exemplo, artrite reumatóide, asma, resposta alérgica, esclerose múltipla, leucemia mielóide e aterosclerose. Evidência publicada sobre estas condições encontra-se resumida abaixo:

Asma e respostas alérgicas

25 Asma bronquial é uma desordem inflamatória persistente comum do pulmão, caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas, superprodução de muco, fibrose e níveis elevados de IgE. Hiper-responsividade das vias aéreas (AHR) é a constrição exagerada das vias aéreas a estímulos não-específicos. Tanto AHR como também a

superprodução de muco são consideradas responsáveis pela obstrução variável das vias aéreas que leva às características de falta de ar dos ataques de asma (exacerbações) e que é responsável pela mortalidade associada com esta doença (em torno de 2000 mortes/ano no Reino Unido).

5 Estudos recentes demonstraram que o GM-CSF e seu receptor são regulados positivamente tanto no nível da proteína como no do mRNA, na asma. Adicionalmente, níveis de expressão correlacionam-se com a gravidade da doença. A produção incrementada de GM-CSF foi medida em fluido de lavagem bronquioalveolar (BAL), células BAL, saliva, células epiteliais
10 bronquiolares, e células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de pacientes de asma, quando comparadas com sujeitos não-asmáticos [31,32]. Adicionalmente, mostrou-se que o nível de expressão, nas vias aéreas, do GM-CSF após exposição a alérgeno correlaciona-se com o grau de eosinofilia tissular e com a gravidade da resposta asmática de fase
15 tardia [33]. Estudos posteriores ligaram a expressão regulada positivamente do GM-CSFR com asma intrínseca ou não-atópica, correlacionando níveis de expressão com dados da função pulmonar [34]. Em um modelo de camundongo de exposição e sensibilização à albumina, a neutralização da atividade do GM-CSF com um anticorpo policlonal de cabra, por meio de
20 administração intranasal antes da exposição à ovalbumina, preveniu a hiper-responsividade das vias aéreas e reduziu tanto a infiltração de eosinófilos e a secreção de muco nas vias aéreas [35]. De maneira análoga, em um modelo de camundongo de doença respiratória alérgica iniciada com a administração intranasal de partículas de exaustão de diesel, neutralização do GM-CSF
25 novamente por meio de administração intranasal de um anticorpo policlonal de cabra preveniu a hiper-responsividade das vias aéreas à metacolina, reduziu as contagens de eosinófilos BAL e também diminuiu a expressão de células de Goblet produtoras de muco no epitélio das vias aéreas [36].

O papel do GM-CSF em respostas alérgicas foi investigado

adicionalmente em modelos murinos de tolerância induzida. Camundongos expostos a dose diárias repetidas de ovalbumina nebulizada sem sensibilização prévia desenvolvem tolerância à ovalbumina e falham em elicitar inflamação eosinofílica das vias aéreas. A expressão pulmonar do GM-CSF via uma construção adenoviral altera as respostas destes animais e favorece o influxo de eosinófilos em BAL, a geração de histologia fenotipicamente alérgica e hiperplasia de células de goblet associada. Esta geração de uma resposta Th2 típica é evidenciada adicionalmente por concentrações incrementadas, no soro e BAL, de IL-5 e IL-4 sérica. Trabalho adicional neste modelo, usando um mouse MHC II KO indica que GM-CSF modula a interação entre células apresentadoras de antígeno e células T nas vias aéreas, facilitando com isso a interação entre células apresentadoras de antígeno e células T nas vias aéreas, facilitando com isso respostas mediadas com células T nas vias aéreas, facilitando com isso respostas mediadas com células T à ovalbumina [37]. É significativo observar que a atividade do GM-CSF como um ativador potente das respostas de Th2 também pode ser demonstrada em camundongos que não apresentam IL-13 e/ou IL-4, indicando que a neutralização da atividade de GM-CSF apresenta uma terapêutica alternativa para as vias aéreas distintas da atividade destas citocinas.

Realizou-se observações similares em outro modelo murino em que a exposição intranasal repetida à erva-de-santiago resulta em sensibilização de tipo Th2 e inflamação branda das vias aéreas quando da re-exposição a antígeno [38]. A administração de anticorpos anti-GM-CSF em conjunto com produção diminuída de citocina associada com Th2 na erva-de-santiago, presumivelmente por meio de inibição de GM-CSF endógeno. Em contraste, o fornecimento de erva-de-santiago a um ambiente de vias aéreas enriquecido com GM-CSF, seja por meio de co-administrações múltiplas de GM-CSF recombinante ou de um fornecimento simples de um vetor

adenoviral portando o transgene de GM-CSF, resultou em inflamação eosinofílica consideravelmente incrementada das vias aéreas e respostas de memória de Th2 específicas para erva-de-santiago.

Artrite reumatóide (RA)

5 A RA é uma doença inflamatória crônica e destrutiva das juntas que afeta aproximadamente 1% da população no mundo industrializado. A RA é caracterizada por hiperplasia e inflamação da membrana sinovial, inflamação no fluido sinovial, e destruição progressiva da cartilagem e do osso circundante que leva comumente a incapacitação
10 significativa.

 Embora a causa da RA ainda permaneça desconhecida, há evidência acumulada do papel do GM-CSF na progressão da RA. Acredita-se que a RA é iniciada e impelida por um processo específico para antígeno, mediado com células T. Em resumo, considera-se que a presença de um
15 antígeno não-identificado em um hospedeiro suscetível inicie uma resposta de células T que leva à produção de citocinas de células T com recrutamento conseqüente de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, macrófagos e células B.

 Muitas citocinas pró- e anti-inflamatórias são produzidas na
20 junta reumatóide. Além disso, a progressão da doença, reativação e silenciamento são mediados por alterações dinâmicas na produção de citocinas na junta. Em particular, considera-se que TNF- α e IL-1 exerçam papéis centrais na patogênese da RA e em muitas das terapias mais novas desenvolvidas, ou no desenvolvimento, para que a doença pareça inibir a
25 atividade destas duas citocinas pró-inflamatórias.

 Estudos recentes em modelos de roedores sugeriram um papel central e não-redundante para o GM-CSF no desenvolvimento e progressão da RA. A administração de GM-CSF recombinante exógeno aumenta a patologia em dois modelos de camundongo diferentes de artrite induzida com colágeno

de RA (CIA) [39] e em um modelo de artrite monoarticular [40]. Adicionalmente a isto demonstrou-se que camundongos com expressão inibida de GM-CSF (GM-CSF^{-/-}) são resistentes ao desenvolvimento de CIA e que os níveis de IL-1 e de fator de necrose de tumor (TNF α) encontrados no fluido de juntas sinovial foi reduzido em comparação com os camundongos de tipo selvagem [41,42]. De maneira análoga, a indução de monoartrite usando injeção intra-articular de albumina de soro bovino metilado e IL-1 em camundongos GM-CSF^{-/-} resulta em gravidade reduzida de doença, em comparação com camundongos de tipo selvagem [43].

Adicionalmente, a administração de mAb anti-GM-CSF murinos melhora significativamente a gravidade da doença em modelos de CIA e de artrite monoarticular. No modelo de CIA, tratamento com mAb foi efetivo no tratamento de progressão de doença estabelecida, histopatologia e diminuição significativa dos níveis de IL-1 e TNF- α nas juntas. Adicionalmente, tratamento com mAb antes do início da artrite diminuiu a gravidade da doença de CIA [44,43].

Diversos estudos analisaram os níveis de citocinas e de receptores presentes no fluido sinovial artrítico e em amostras de biópsia de membranas de tecido humano. Células mononucleares circulantes em 27 pacientes de RA, 13 voluntários saudáveis e 14 pacientes com osteoporose foram avaliadas quanto aos níveis de GM-CSFR por meio do uso de GM-CSF marcado com PE [45]. Neste estudo demonstrou-se que foi possível detectar duas vezes a quantidade de células positivas para receptor em pacientes de RA (53%), em comparação com controles saudáveis (20%) e pacientes sendo submetidos a investigação quanto a osteoporose (25%), sugerindo com isso que monócitos podem ser preparados para responderem a GM-CSF produzido localmente. A expressão de genes de citocina de pacientes de RA [46] usando hibridização *in situ* de células SF demonstrou níveis elevados de GM-CSF, IL-1, TNF- α e IL-6. Adicionalmente, sinoviócitos derivados de fibroblastos

isolados e cultivados obtidos de voluntários normais demonstraram níveis elevados de proteínas de GM-CSF em resposta a IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e TNF- β [47]. A quantificação dos níveis séricos do GM-CSF em pacientes de RA [48] mostrou que níveis de proteína foram incrementados em pacientes de RA grave (366 pg/ml, n=26) e moderada (376 pg/ml, n=58) em comparação com o grupo de controle (174 pg/ml, n=43), e adicionalmente mostrou-se também que GM-CSF foi significativamente elevado no SF de pacientes com RA (1300 pg/ml).

Observou-se previamente que a administração de GM-CSF recombinante em pacientes sendo tratados de neutropenia poderia causar uma exacerbação da RA [50]. Realizou-se observações similares para um paciente com síndrome de Felty após tratamento com GM-CSF recombinante [50].

Doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD)

Doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) é definida como um estado de doença caracterizado por limitação do fluxo de ar que não é totalmente reversível. A limitação crônica de fluxo de ar é usualmente tanto progressiva como também associada com uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos. Esta limitação de fluxo de ar é causada por uma mistura de doença das vias aéreas pequenas (bronquiolite obstrutiva) e destruição parenquimal (enfisema), sendo que as suas contribuições relativas variam de pessoa para pessoa. Os sintomas característicos resultantes da doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) são a tosse, produção de esputo, e dispnéia ao exercício. A COPD é um problema de saúde pública e é a quarta causa principal de morbidez crônica e de mortalidade nos E.U.A. A doença é tratada correntemente com drogas desenvolvidas originalmente para a asma, como corticosteróides orais ou inalados, com ou sem broncodilatadores incluindo β agonistas. No entanto, nenhuma destas drogas mostrou diminuir a progressão da COPD [51]. Por exemplo, corticosteróides que suprimem marcadamente a inflamação

eosinofílica na asma não parecem exercer qualquer efeito sobre a inflamação observada na COPD que é mediada predominantemente por neutrófilos [52]. Conseqüentemente, há uma necessidade de desenvolver novos tratamentos para COPD que objetivam especificamente os processos inflamatórios subjacentes à patofisiologia desta doença. GM-CSF, através de seu papel na função de neutrófilos e macrófagos, pode desempenhar um papel importante na patogênese da COPD.

Em um estudo que usa PCR quantitativa, mostrou-se que, em esputo de COPD comparado com esputo de fumantes não-obstruídos, o número de cópias do GMCSF foi significativamente elevado [53]. Adicionalmente, em um modelo de roedor de inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro, animais tratados intranasalmente com um anticorpo para GM-CSF 2 dias, 4 h e 1 h antes da exposição à fumaça demonstraram uma redução significativa dos níveis de neutrófilos, macrófagos e MMP-9 do BAL, quando comparado com o anticorpo de controle de isótipo 5 dias após a exposição [54]. Estes estudos também são corroborados por nossas próprias observações em que se pesquisou níveis de GM-CSF em esputo induzido de pacientes com uma gama de gravidades de COPD. Nestes estudos, nós mostramos que o GM-CSF foi elevado no esputo de aproximadamente 40% dos pacientes de COPD testados independentemente da gravidade da doença, com níveis de GMCSF aproximando-se de 500 pg/ml em alguns casos. O GMCSF não pareceu ser elevado em pacientes não fumantes e em pacientes de controle fumantes equiparados. Estes dados sugerem que o GM-CSF pode ser um dos mediadores-chave na inflamação das vias aéreas induzida por fumaça, e na COPD.

Esclerose múltipla (MS)

O GM-CSF foi implicado na doença autoimune esclerose múltipla. Mediante a administração de antígeno de glicoproteína de oligodendrócitos de mielina (MOG) a roedores, é possível induzir um modelo

de esclerose múltipla humana que demonstra muitos dos fenótipos da MS, como inflamação do sistema nervoso central e desmielinação que pode resultar em uma paralisia similar à da MS. Em camundongos sem GM-CSF a MOG foi incapaz de induzir o fenótipo EAE [55]. Adicionalmente, mostrou-se que estes camundongos apresentaram proliferação diminuída de células T relativamente ao antígeno de MOG e uma produção diminuída das citocinas de Th1, IL-6 e IFN- γ . A administração de anticorpos neutralizadores de GM-CSF ao mesmo tempo como exposição de antígeno preveniu o início da doença durante 10 dias após o tratamento com evidência de lesões reduzidas. Se administrados após o início da doença, camundongos recuperaram-se completamente dentro de 20 dias do tratamento [55].

Leucemia

O GM-CSF também foi implicado na leucemia mielóide, leucemia mielóide crônica juvenil (JCML). Esta condição é uma desordem mieloproliferativa que afeta primariamente pacientes com menos de 4 anos de vida. Progenitores de macrófagos-granulócitos periféricos de JCML *in vitro* (CFU-GM) demonstram proliferação espontânea a baixas densidades de células, uma observação não previamente descrita para outras desordens mieloproliferativas. Adicionalmente, a depleção de monócitos destas culturas aboliu esta proliferação. Subseqüentemente, demonstrou-se que esta proliferação espontânea é mediada via uma hipersensibilidade dos progenitores de JCML ao GM-CSF de citocina derivado de monócitos [56,57,58,59,60,61]. Ao invés de uma superprodução ou de níveis elevados de GM-CSF em pacientes de JCML, a hipersensibilidade dos progenitores de JCML parece ser através de uma via de transdução de sinal de Ras induzida com GM-CSF desregulado [62]. Estudos recentes com um análogo de GM-CSF (E21R), que antagoniza a ação de GM-CSF tanto em estudos de ligação como em ensaios funcionais, mostrou que inibindo-se a ação de GM-CSF, é possível reduzir significativamente a carga de células de JCML em um modelo de enxerto

exógeno de camundongo imunodeficiente/não obeso combinado grave diabético (SCID/NOD) de JCML [63]. A dosagem sistêmica profilática de E21R no momento do enxerto preveniu que progenitores de JCML se estabelecessem na medula óssea, e a dosagem de E21R 4 semanas após o enxerto induziu remissão de JCML, com uma redução da carga celular. Adicionalmente, a administração de E21R a camundongos SCID/NOD co-enxertados com medula óssea humana normal e medula óssea com JCML causou uma redução da carga de JCML, no entanto, células de medula óssea normal permaneceram não-afetadas.

10 *Aterosclerose*

Doença do coração isquêmico é a causa mais comum de morte em todo o mundo. Ao longo dos anos mais recentes, fortaleceu-se o conceito de que a inflamação desempenha um papel significativo na patogênese da aterosclerose, com acúmulo de células inflamatórias ocorrendo par-e-passo com o acúmulo de lipídios nas paredes arteriais.

Uma vez residentes nas paredes arteriais, células inflamatórias, como monócitos e macrófagos, participam e perpetuam a resposta inflamatória local. Estes macrófagos também expressam receptores aglutinadores para uma gama de lipoproteínas e, assim, contribuem para a diferenciação de células em ‘células espumosas’. É a morte destas ‘células espumosas’ que contribui para o desenvolvimento do núcleo lipídico, uma característica clássica destas lesões. Como a inflamação continua no interiores destas placas ateroscleróticas, estas células inflamatórias ativadas liberam mediadores fibrogênicos e fatores de crescimento que promovem proliferação de células musculares lisas (SMC) e fibrose da placa. Além de promoverem fibrose, estas células também liberam enzimas proteolíticas, Metaloproteinases de matriz (MMPs), que contribuem para um enfraquecimento da placa fibrótica tornando-as, desta forma, propensas a rompimento. Uma vez rompidas, estas placas liberam fragmentos celulares e fatores de coagulação,

como fator de tecido, no vaso, estimulando a cascata de coagulação e o desenvolvimento de trombos. A trombose arterial resultante pode levar, então, a isquemia miocárdica ou a infarto.

Recentemente o GM-CSF foi implicado em muitos aspectos da
5 progressão de doença na aterosclerose. Em lesões ateroscleróticas de coelhos alimentados com colesterol, verificou-se que o GM-CSF encontra-se co-localizado com macrófagos e, em menor grau, com células endoteliais e células musculares lisas (SMC) [64]. Adicionalmente, mostrou-se também que a expressão de GM-CSF é aumentada em vasos ateroscleróticos humanos
10 nos sítios de acúmulo de macrófagos e em SMCs mediais e células endoteliais [65]. Este aumento dos níveis de GM-CSF é atribuído, em parte, ao contato direto célula-a-célula de monócitos/macrófagos e células endoteliais durante a formação e patogênese da lesão aterosclerótica [66]. Outro elemento-chave na lesão aterótica é a ‘célula espumosa’, ou seja, macrófagos que absorveram
15 lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas via receptores de aglutinadores sobre a superfície. *In vitro*, esta absorção de Ox-LDL pode estimular ainda mais macrófagos a proliferarem via um mecanismo dependente de GM-CSF [67].

Como a aterosclerose é um processo inflamatório crônico,
20 investigou-se agentes antiinflamatórios, como glucocorticóides. Dexametasona, um glucocorticóide antiinflamatório, suprime o desenvolvimento da aterosclerose em vários modelos animais experimentais [68,69,70,71]. A eficácia do que foi atribuído à inibição da migração de SMC [72] e proliferação [73], e redução da quimiotaxia de monócitos e leucócitos
25 circulantes [74]. Estudos recentes mostram que ox-LDL pode induzir liberação de GM-CSF de macrófagos peritoneais de camundongo [75]. Adicionalmente, após tratamento com dexametasona esta liberação de GM-CSF foi inibida de uma forma dependente da dose, sugerindo que os efeitos antiinflamatórios da dexametasona são mediados pela inibição da produção de

GM-CSF induzida com ox-LDL. Como parece que o GM-CSF possui um papel central na aterosclerose, uma alternativa aos glucocorticóides poderia ser a inibição da atividade de GM-CSF nesta indicação.

Terminologia

5 “E/ou” onde usado aqui deve ser considerado como revelação específica de cada uma das duas características ou componentes especificados com ou sem o outro. Por exemplo, “A e/ou B” deve ser considerado como uma revelação específica de cada um de (i) A, (ii) B e (iii) A e B, como se cada um fosse indicado individualmente aqui.

10 ***GM-CSFR α e GM-CSF***

GM-CSFR α é a cadeia alfa do receptor para fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos. A sequência de comprimento pleno do GM-CSFR α humano é depositado sob o número de acesso S06945 (gi:106355) [76] e indicada aqui como na SEQ ID NO: 202. A forma madura
15 do GM-CSFR α humano, i.e. com o peptídeo-sinal clivado, é indicada aqui como SEQ ID NO: 206. Exceto se indicado de outra forma no contexto, referências aqui a GM-CSFR α referem-se a GM-CSFR α de primatas humanos ou não-humanos (p. ex., [macacos] cynomolgus), normalmente humano. GM-CSFR α pode ser GM-CSFR α naturalmente ocorrente ou GM-
20 CSFR α recombinante.

O domínio extracelular de 298 aminoácidos do receptor de GM-CSF humano α possui uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 205.

Exceto se indicado de outra forma no contexto, referências aqui a GM-CSF referem-se a GM-CSF de primatas humanos ou não-humanos
25 (p. ex. cynomolgus), normalmente humano.

GM-CSF liga-se normalmente ao domínio extracelular (SEQ ID NO: 205) da cadeia α do receptor de GM-CSF maduro (SEQ ID NO: 206). Como descrito alhures aqui, esta ligação é inibida por elementos de ligação da invenção.

Variantes de recomposição naturalmente ocorrentes do GM-CSFR α foram identificadas - ver, por exemplo, refs. [77 e 78]. O domínio extracelular é altamente conservado nestas variantes de recomposição. Elementos de ligação da invenção podem ou não ligar-se a uma ou mais variantes de recomposição do GM-CSFR α , e podem ou não inibir a ligação de GM-CSF a uma ou mais variantes de recomposição do GM-CSFR α .

Elemento de ligação

Isto descreve um elemento de um par de moléculas que se ligam uma à outra. Os elementos de um par de ligação podem ser derivados naturalmente ou produzidos totalmente ou parcialmente por via sintética. Um membro do par de moléculas apresenta uma área sobre sua superfície, ou uma cavidade, que se liga, e que, portanto, é complementar a uma organização espacial e polar particular do outro membro do par de moléculas. Exemplos de tipos de pares de ligação são antígeno-anticorpo, biotina-avidina, hormônio-receptor de hormônio, receptor-ligante, enzima-substrato. A presente invenção refere-se a reações de tipo antígeno-anticorpo.

Um elemento de ligação compreende normalmente uma molécula apresentando um sítio de ligação de antígeno. Por exemplo, um elemento de ligação pode ser uma molécula de anticorpo ou uma proteína não-anticorpo que compreende um sítio de ligação de antígeno. Um sítio de ligação de antígeno pode ser proporcionado por meio de arranjo de CDRs sobre suportes de proteína não-anticorpo, como fibronectina ou citocromo B etc. [80,81,82], ou por meio de randomização ou mutação de radicais de aminoácidos de uma alça dentro de uma estrutura de suporte de proteína para conferir ligação a um alvo desejado. Estruturas de suporte para a manipulação de sítios de ligação inéditos em proteínas foram revistos detalhadamente [82]. Estruturas de suporte de proteínas para emuladores de anticorpo encontram-se divulgadas no WO/0034784 em que os inventores descrevem proteínas (emuladores de anticorpo) que incluem um domínio de

fibronectina de tipo III apresentando pelo menos uma alça randomizada. Uma estrutura de suporte vantajosa sobre a qual enxertar uma ou mais CDRs, p. ex. um conjunto de HCDRs, pode ser proporcionada por qualquer elemento de domínio da superfamília de genes de imunoglobulina. A estrutura de suporte
5 pode ser uma proteína humana ou não-humana.

Uma vantagem de uma estrutura de suporte de proteína não-anticorpo é que ela pode proporcionar um sítio de ligação de antígeno em uma molécula de estrutura de suporte que é menor e/ou mais fácil de fabricar do que pelo menos algumas moléculas de anticorpos. O pequeno tamanho de
10 um elemento de ligação pode conferir propriedades fisiológicas úteis, como uma capacidade de entrar em células, penetrar profundamente em tecidos ou atingir alvos em outras estruturas, ou de ligar-se em cavidades de proteína do antígeno-alvo.

O uso de sítios de ligação de antígeno em estruturas de
15 suporte de proteína não-anticorpo é revista na ref. [79]. São típicas as proteínas apresentando uma espinha dorsal estável e uma ou mais alças variáveis, em que a seqüência de aminoácidos da alça ou alças é mutada especificamente ou randomicamente para criar um sítio de ligação de antígeno apresentando, para ligação ao antígeno-alvo. Referidas proteínas
20 incluem os domínios de ligação de IgG de proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (p. ex., domínio de tipo III da 10^a fibronectina) e lipocalinas. Outras abordagens incluem "microcorpos" sintéticos (Selecore GmbH), que se baseiam em ciclotídeos - pequenas proteínas apresentando ligações dissulfeto intramoleculares.

25 Adicionalmente a seqüências de anticorpos e/ou um sítio de ligação de antígeno, um elemento de ligação de acordo com a presente invenção pode compreender outros aminoácidos, p. ex. formando um peptídeo ou polipeptídeo, como um domínio dobrado, ou para conferir à molécula outra característica funcional adicionalmente à capacidade de ligar-se a

antígeno. Elementos de ligação da invenção podem portar um marcador detectável, ou podem ser conjugados a uma toxina ou a uma enzima ou porção de objetivação (p. ex. via uma ligação peptídica ou ligante). Por exemplo, um elemento de ligação pode compreender um sítio catalítico (p. ex. em um domínio de enzima) e também como um sítio de ligação de antígeno, sendo que o sítio de ligação de antígeno liga-se ao antígeno e, assim, objetiva o sítio catalítico ao antígeno. O sítio catalítico pode inibir a função biológica do antígeno, p. ex. por meio de clivagem.

No entanto, como indicado, CDRs podem ser portadas por estruturas de suporte, como fibronectina ou citocromo B [80,81,82], a estrutura para portar uma CDR ou um conjunto de CDRs da invenção será geralmente de uma seqüência de anticorpo de cadeia pesada ou leve ou porção substancial da mesma em que a CDR ou conjunto de CDRs encontra-se localizado em um local correspondente à CDR ou conjunto de CDRs de domínios variáveis VH e VL de anticorpos naturalmente ocorrentes codificados por genes de imunoglobulina rearranjados. As estruturas e localizações de domínios variáveis de imunoglobulina podem ser determinadas fazendo-se referência a Kabat, *et al.*, 1987 [98], e suas atualizações, agora disponíveis na Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu> ou procurar “Kabat” usando qualquer mecanismo de busca).

Elementos de ligação da presente invenção podem compreender regiões constantes de anticorpos ou partes dos mesmo, de preferência, regiões constantes de anticorpos humanos ou partes dos mesmo. Por exemplo, um domínio VL pode ser ligado a sua ponta C aos domínios constantes de cadeia leve de anticorpo incluindo cadeias C κ ou C λ humanas, de preferência, cadeias C λ . De maneira análoga, um elemento de ligação baseado em um domínio VH pode ser ligado a sua ponta C-terminal a toda ou parte (p. ex. um domínio CH1) de uma cadeia pesada de imunoglobulina derivada de qualquer isótipo de anticorpo, p. ex., IgG, IgA, IgE e IgM e

qualquer uma das subclasses de isotipos, particularmente IgG1, IgG2 e IgG4. IgG1, IgG2 ou IgG4 é preferida. IgG4 é preferida porque não se liga a complemento e não cria funções efectoras. Qualquer variante sintética ou variante de região constante que possui estas propriedades e estabiliza regiões variáveis também é preferida para uso em concretizações da presente invenção.

Elementos de ligação da invenção podem ser marcados com um marcador detectável ou funcional. Marcadores detectáveis incluem rádio-marcadores, como ^{131}I ou ^{99}Tc , que podem ser ligados a anticorpos da invenção usando-se química convencional conhecida na arte da visualização de anticorpos. Marcadores também incluem marcadores de enzimas, como peroxidase de rabanete. marcadores incluem adicionalmente porções químicas, como biotina, que podem ser detectadas via ligação a uma por meio de detectável cognata específica, p. ex. avidina marcada. Assim, um elemento de ligação ou molécula de anticorpo da presente invenção pode ser em forma de um conjugado compreendendo o elemento de ligação e um marcador, opcionalmente conjugado via um ligante, como um peptídeo. O elemento de ligação pode ser conjugado, por exemplo, a enzimas (p. ex. peroxidase, fosfatase alcalina) ou um marcador fluorescente incluindo, embora sem limitação, biotina, fluorocromo, proteína fluorescente verde. Adicionalmente, o marcador pode compreender uma porção de toxina, como uma porção de toxina selecionada do grupo que consiste de exotoxina de *Pseudomonas* (PE ou um fragmento citotóxico ou mutante do mesmo), toxina de *Difteria* (um fragmento citotóxico ou mutante do mesmo), uma toxina de *botulinum* de A até F, ricina ou um fragmento citotóxico da mesma, abrina ou um fragmento citotóxico da mesma, saporina ou um fragmento citotóxico da mesma, toxina antiviral da *Phytolacca americana* ou um fragmento citotóxico da mesma e briodina 1 ou um fragmento citotóxico da mesma. Onde o elemento de ligação compreende uma molécula de anticorpo,

o elemento de ligação marcado pode ser referido como um imunoconjugado.

Molécula de anticorpo

Descreve-se aqui uma imunoglobulina, quer seja natural, ou produzida parcialmente ou totalmente por via sintética. O termo também
5 compreende qualquer polipeptídeo ou proteína compreendendo um sítio de ligação de antígeno de anticorpo. Fragmentos de anticorpos que compreendem um sítio de ligação de antígeno de anticorpo são moléculas, como Fab, F(ab')₂, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; e diacorpos.

É possível preparar anticorpos monoclonais e outros
10 anticorpos, e usar técnicas de tecnologia de DNA recombinante para produzir outros anticorpos ou moléculas quiméricas que conservam a especificidade do anticorpo original. Referidas técnicas podem envolver introduzir DNA que codifica a região variável de imunoglobulina, ou as CDRs, de um anticorpo nas regiões constantes, ou regiões constantes mais regiões de estrutura, de uma
15 imunoglobulina diferente. Ver, por exemplo, a EP-A-184187, GB 2188638A ou EP-A-239400, e um grande corpo de literatura subsequente. Um hibridoma ou outra célula produtora de um anticorpo pode ser sujeita a mutação genética ou outras alterações, que podem ou não alterar a ligação-a-alvo dos anticorpos produzidos.

20 Como anticorpos podem ser modificados de diversas maneiras, o termo "molécula de anticorpo" deveria interpretado como abrangendo qualquer elemento de ligação ou substância apresentando um sítio de ligação de antígeno de anticorpo. Assim, este termo abrange fragmentos de anticorpos e derivados, incluindo qualquer polipeptídeo compreendendo um sítio de
25 ligação de antígeno de anticorpo, quer natural, ou totalmente ou parcialmente sintético. Inclui-se, portanto, moléculas quiméricas compreendendo um sítio de ligação de antígeno de anticorpo, ou equivalente, fundidas a outro polipeptídeo. A clonagem e expressão de anticorpos quiméricas são descritas na EP-A-0120694 e EP-A-0125023, e um grande corpo de literatura

subseqüente.

Técnicas adicionais disponíveis na arte da manipulação de anticorpos tornaram possível isolar anticorpos humanos e humanizados. Anticorpos humanos e humanizados são concretizações preferidas da invenção, e podem ser produzidos usando-se qualquer método vantajoso. Por exemplo, é possível preparar hibridomas humanos [83]. Apresentação de fago, outra técnica estabelecida para gerar elementos de ligação foi descrita detalhadamente em muitas publicações, como ref. [83] e WO92/01047 (discutido adicionalmente abaixo). Camundongos transgênicos em que os genes de anticorpo de camundongo são inativados e substituídos funcionalmente por genes de anticorpos humanos, enquanto deixa intactos outros componentes do sistema imunológico de camundongo, podem ser usados para isolar anticorpos humanos [84]. Anticorpos humanizados podem ser produzidos usando-se técnicas conhecidas na arte, como aquelas divulgadas, por exemplo, nos WO91/09967, US 5,585,089, EP592106, US 565,332 e WO93/17105. Adicionalmente, WO2004/006955 descreve métodos para humanizar anticorpos, com base na seleção de seqüências de estrutura de região variável de genes de anticorpo humano por meio de comparação de tipos de estruturas de CDR canônicas para seqüências de CDR da região variável de um anticorpo não-humano, com tipos de estrutura de CDR canônicas para CDRs correspondentes de uma biblioteca de seqüências de anticorpos humanos, p. ex. segmentos de genes de anticorpos de linhagem germinal. Regiões variáveis de anticorpos humanos apresentando tipos de estrutura de CDR canônica similares às CDRs não-humanas formam um subconjunto de seqüências-membro de anticorpos humanos das quais se seleciona seqüências de estrutura humana. Os elementos de subconjunto podem ser classificados adicionalmente por meio de similaridade de aminoácidos entre as seqüências de CDR humana e não-humana. No método do WO2004/006955, seqüências humanas de classificação superior são selecionadas de forma a proporcionar

as seqüências de estrutura para construir um anticorpo quimérico que substitui funcionalmente seqüências de CDR humanas pelas contrapartes de CDR não-humanas usando-se as estruturas humanas de elemento de subconjunto selecionadas, proporcionando com isso um anticorpo humanizado com alta afinidade e baixa imunogenicidade sem a necessidade de comparar seqüências de estrutura entre os anticorpos não-humanos e humanos. Divulga-se também anticorpos quiméricos preparados de acordo com o método.

Moléculas de anticorpos sintéticas podem ser criadas por meio de expressão de genes gerados por meio de oligonucleotídeos sintetizados e montados dentro de vetores de expressão vantajosos [85, 86].

Mostrou-se que fragmentos de um anticorpo inteiro podem realizar a função de antígenos de ligação. Exemplos de fragmentos de ligação são (i) o fragmento Fab que consiste de domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) o fragmento Fd que consiste dos domínios VH e CH1; (iii) o fragmento Fv que consiste dos domínios VL e VH de um anticorpo simples; (iv) o fragmento dAb [87,88,89] que consiste de um domínio VH ou um domínio VL; (v) regiões de CDR isoladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, um fragmento divalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados[:]; (vii) moléculas de Fv de cadeia simples (scFv), sendo que um domínio VH e um domínio VL são ligados por um ligante peptídico que permite que os dois domínios se associem para formar um sítio de ligação de antígeno [90,91]; (viii) dímeros de Fv de cadeia simples biespecíficos (PCT/US92/09965) e (ix) "diacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por meio de fusão de gene (WO94/13804; [92]). Fv, scFv ou moléculas de diacorpos podem ser estabelecidas pela incorporação de pontes dissulfeto que ligam os domínios VH e VL [93]. Também é possível preparar minicorpos compreendendo um scFv conjugado a um domínio CH3 [94].

Um dAb (anticorpo de domínio) é um fragmento de

imunoglobulina de antígeno monomérico pequeno de um anticorpo, nominalmente a região variável de uma cadeia pesada ou célula de anticorpo [89]. dAbs de VH ocorrem naturalmente em camelídeos (p. ex., camelo, lhama) e pode ser produzido imunizando-se um camelídeo com um antígeno-alvo, isolando-se células B específicas para antígeno, e clonando diretamente genes de dAb das células B individuais. dAbs também podem ser produzidos em cultura de células. Seu pequeno tamanho, boa solubilidade e estabilidade à temperatura torna-os particularmente úteis fisiologicamente e vantajosos para seleção e maturação por afinidade. Um elemento de ligação da presente invenção pode ser um dAb compreendendo um domínio VH ou domínio VL substancialmente como indicado aqui, ou um domínio VH ou domínio VL compreendendo um conjunto de CDRs substancialmente como indicado aqui. Por "substancialmente como indicado" compreende-se que o domínio VH ou domínio VL de CDR da invenção será idêntico ou muito similar às regiões especificadas cuja seqüência é indicada aqui. Por "muito similar" compreende-se que, é possível realizar de 1 a 5, de preferência, de 1 a 4, como de 1 a 3 ou 1 ou 2, ou 3 ou 4, substituições de aminoácidos na CDR e/ou domínio VH ou VL.

Onde se pretende usar anticorpos biespecíficos, estes podem ser anticorpos biespecíficos convencionais, que podem ser fabricados de diversas maneiras [95], p. ex., preparados quimicamente ou de hibridomas híbridos, ou podem ser quaisquer dos fragmentos de anticorpos biespecíficos descritos acima. Exemplos de anticorpos biespecíficos incluem aqueles da tecnologia BiTETM em que os domínios de ligação de dois anticorpos com uma especificidade diferente podem ser usados e ligados diretamente via peptídeos flexíveis curtos. Isto combina dois anticorpos em uma cadeia de polipeptídeo simples curta. Diacorpos e scFv podem ser construídos sem uma região Fc, usando-se apenas domínios variáveis, reduzindo potencialmente os efeitos de reação anti-idiotípica.

Diacorpos biespecíficos, em oposição a anticorpos inteiros biespecíficos, também podem ser particularmente úteis porque podem ser facilmente construídos e expressos em *E.coli*. Diacorpos (e muitos outros polipeptídeos, como fragmentos de anticorpos) com especificidades de ligação específicas podem ser selecionados facilmente usando-se apresentação de fago (WO94/13804) de bibliotecas. Se um braço do diacorpo tiver que ser mantido constante, por exemplo, dirigido contra GM-CSFR α , então é possível preparar uma biblioteca em que o outro braço é variado, e um anticorpo de ligação-alvo apropriado selecionado. Anticorpos inteiros biespecíficos podem ser preparados por meio de manipulação de tipo botões-em-furos [96].

Sítio de ligação de antígeno

Descreve-se aqui a parte de uma molécula que se liga a, e que é complementar a todo ou parte do antígeno-alvo. Em uma molécula de anticorpo, isto é referido como o sítio de ligação de antígeno de anticorpo, e compreende a parte do anticorpo que se liga a, e que é complementar a todo ou a parte do antígeno-alvo. Onde um antígeno é grande, um anticorpo só pode ser ligado a uma parte particular do antígeno, sendo que referida parte é denominada um epitopo. Um sítio de ligação de antígeno de anticorpo pode ser proporcionado por um ou mais domínios variáveis de anticorpo. De preferência, um sítio de ligação de antígeno de anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve (VL) de anticorpo e uma região variável de cadeia pesada (VH) de anticorpo.

Numeração de Kabat

Radicais de seqüências de anticorpo aqui são referidos geralmente usando-se numeração Kabat como definido em Kabat *et al.*, 1971 [97]. Ver também refs. [98,99].

Isolado

Refere-se aqui ao estado em que elementos de ligação da invenção, ou ácido nucleico que codifica referidos elementos de ligação,

geralmente estará de acordo com a presente invenção. Elementos isolados e ácido nucleico isolado serão livres ou substancialmente livres de material com o qual eles se encontram naturalmente associados, como outros polipeptídeos ou ácidos nucleicos com os quais eles são encontrados em seu ambiente natural, ou o ambiente em que eles são preparados (p. ex., cultura de células) quando referida preparação é por meio de tecnologia de DNA recombinante praticada *in vitro* ou *in vivo*. Elementos e ácido nucleico podem ser formulados com diluentes ou adjuvantes e, ainda, para fins práticos, podem ser isolados - por exemplo, os elementos serão normalmente misturados com gelatina ou outros veículos se usado para revestir placas de microtitulação para uso em ensaios imunológicos, ou serão misturados com diluentes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis quando usados no diagnóstico ou na terapia. Elementos de ligação podem ser glicosilados, quer naturalmente ou por meio de sistemas de células eucarióticas heterólogas (p. ex., células CHO ou NSO (ECACC 85110503)), ou eles podem permanecer não-glicosilados (por exemplo, se produzidos por meio de expressão em uma célula procariótica).

Breve descrição dos desenhos

Figura 1. Análise de pA_2 de dois anticorpos anti-GM-CSFR α no ensaio de proliferação de TF-1. A proliferação de células TF-1 foi induzida com concentrações crescentes de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de duas IgG4 otimizadas, Anticorpo 6 (Figura 1A) e Anticorpo 1 (Figura 1B), respectivamente. Para dados mostrados no gráfico 1A e no gráfico 1B, mediu-se a incorporação de timidina tritiada, e calculou-se a EC50 de GM-CSF em cada concentração de anticorpo. Para dados mostrados no gráfico 1C e gráfico 1D, calculou-se então as relações de doses e analisou-se por meio de regressão de Schild para se obter valores de pA_2 .

Figura 2. Análise de pA_2 de um anticorpo anti-GM-CSFR α , Anticorpo 6, nos ensaios de alteração de forma de granulócitos. Granulócitos

humanos (gráfico 2A e 2C) ou de cynomolgus (2B e 2D) foram tratados com concentrações crescentes de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de IgG4. A alteração de forma dos granulócitos foi medida usando-se citometria de fluxo, e calculou-se a EC50 do GM-CSF em cada
5 concentração de anticorpo (gráfico 2A e gráfico 2B). Em seguida, as relações de dose foram calculadas e analisadas por meio de regressão de Schild para se obter valores de pA_2 (gráfico 2C e gráfico 2D).

Figura 3. Potência antagonista de dois anticorpos, Anticorpos 1 e 6, respectivamente, como IgG4s em um ensaio que mede a proliferação de
10 células TF-1 induzida por 7pM de GM-CSF humano. Mostra-se também dados para controle positivo IgG4 2B7 e para um isótipo de controle IgG4. Dados representam a média com barras de desvio padrão de determinações em triplicata no mesmo experimento.

Figura 4. Potência antagonista de dois anticorpos, Anticorpos
15 1 e 6, respectivamente, como IgG4s em um ensaio que mede a alteração de forma de granulócitos humanos induzida por 7pM de GM-CSF humano. Mostra-se também dados para o controle de IgG4 2B7 e para um isótipo de controle IgG4. Dados representam a média com barras de desvio padrão de determinações em triplicata no mesmo experimento.

Figura 5. Potência antagonista de dois anticorpos, Anticorpos
20 1 e 6, respectivamente, como IgG4s em um ensaio que mede a liberação de $TNF\alpha$ de monócitos humanos estimulada com 1 nM de GM-CSF humano. Mostra-se também dados para anticorpo de controle 2B7 e para um controle de isótipo IgG4. Dados representam a média com barras de desvio padrão de
25 determinações em triplicata no mesmo experimento.

Figura 6. Potência antagonista de dois anticorpos, Anticorpos 1 e 6, respectivamente, como IgG4s em um ensaio que mede a sobrevivência de granulócitos humanos induzida por 7pM de GM-CSF humano. Mostra-se também dados para o anticorpo de controle 2B7 e para um isótipo de controle

IgG4. Dados representam a média com barras de desvio padrão de determinações em triplicata no mesmo experimento.

Figura 7. mAbs humanos maturados por afinidade Anticorpo 1 e Anticorpo 6, mas não o mAb humano parental 28G5 (Anticorpo 3) ou o anticorpo murino conhecido 2B7, inibem diferenciação impelida por GM-CSF de progenitores hemopoiéticos humanos. 5×10^4 Células mononucleares descongeladas de uma amostra de aferese foram cultivadas em agar semi-sólido na presença de 10 ng/ml de GM-CSF e na concentração indicada de mAb. Colônias foram contadas no dia 14. Gráfico mostra número de colônias contra a concentração de mAb em $\mu\text{g/ml}$.

Figura 8. Análise dose-resposta da eficácia de mAb maturado por afinidade em camundongos quiméricos Tg huGM-CSFR. Grupos de 5 camundongos quiméricos Tg foram tratados com 500 ng de huGM-CSF (ou PBS) s.c. duas vezes ao dia durante 4 dias (D.1-D.4) e controle (CAT001) ou mAb de teste (Anticorpo 6) nas concentrações indicadas no D.0. Pesos dos baços foram avaliados no D.5.

Figura 9. Análise dose-resposta da eficácia do Anticorpo 6 em um ensaio de liberação de citocinas endógenas de células mononucleares de sangue periférico humano. 1×10^6 Células foram cultivadas durante 72 h. na presença e ausência de anticorpo e realizou-se um ELISA de IL-6 e TNF α nos sobrenadantes. Dados representam a inibição média com barras de desvio padrão de determinações em duplicata no mesmo experimento.

Parte Experimental

Fundamento

Fragmentos de anticorpos humanos podem ser selecionados *in vitro* a partir de repertórios apresentados sobre a superfície de bacteriófago filamentoso. Este processo é conhecido como apresentação de fago e proporciona um meio de derivar fragmentos de anticorpos humanos. O processo pode ser usado para isolar especificidades anti-humanas humanas e

pode ser ajustado para derivar anticorpos com características de afinidade particulares.

Fragmentos de anticorpos consistindo apenas dos domínios variáveis de cadeia pesada (VH) e variáveis de cadeia leve (VL) conjugados por um ligante de peptídeo curto contêm toda a informação que é necessária para se determinar a ligação de antígeno. Referidos fragmentos são conhecidos como Fv de cadeia simples (scFv). Mostrou-se que quando apresentados na superfície do fago, scFv dobram-se corretamente e ligam-se ao antígeno. Repertórios grandes de scFv foram construídos desta maneira, e proporcionaram uma fonte da qual é possível isolar clones individuais para o desenvolvimento de candidatos a droga. ScFv candidatos são então formatados como moléculas de IgG integral (tipicamente IgG humana) para aplicações terapêuticas.

Sumário

Realizou-se seleções em uma biblioteca de apresentação de fago de scFv derivada de linfócitos de baço humanos para enriquecer populações de fagos que se ligam a GM-CSFR α humano. Nós isolamos anticorpos scFv apresentando características selecionadas e convertimos estes scFv em IgG₄. Usando-se uma variedade de ensaios, um painel de anticorpos foi isolado, otimizado e foi submetido a terapia de linhagem germinal para produzir IgG₄ com especificação apropriada para um anticorpo terapêutico.

Clones de anticorpo, cujas seqüências são mostradas como anticorpos 1, 2 e de 4 a 20 na listagem de seqüências, foram derivados de um anticorpo parental. O parental é mostrado como anticorpo 3 na listagem de seqüências, e também é referido aqui como 28G5. Os 19 clones foram selecionados de acordo com o fato de mostrarem propriedades particularmente boas numa faixa de ensaios biológicos, como descrito na Parte Experimental, e foram designados com números de anticorpos 1, 2 e de 4 a 20.

Os bioensaios foram designados de forma a refletirem a

natureza inflamatória de doenças, como artrite reumatóide. Por exemplo, a alteração de forma de neutrófilos necessária para o seu recrutamento ao sítio de ação, a liberação de fatores pró-inflamatórios por monócitos e a sobrevida incrementada de tipos de células inflamatórias em resposta a sinais particulares. Os anticorpos apresentam potente atividade de neutralização nestes ensaios.

Protocolos detalhados dos métodos de ensaio usados são apresentados abaixo na seção intitulada "Materiais e métodos de ensaio".

Isolamento de anticorpos *lead*

Usou-se uma grande biblioteca de anticorpos humanos de FV de cadeia simples (scFv) para seleções. Isto foi derivado dos linfócitos de baço de 20 doadores saudáveis, e clonado em um vetor de fagomídeo. ScFvs que reconheceram GM-CSFR α foram isolados da biblioteca de apresentação de fago numa série de ciclos de seleção repetidos em GMCSF-R α purificado derivado da superexpressão de um domínio extracelular, solúvel, marcado com purificação do receptor em células HEK293T. Isto foi obtido substancialmente como descrito por Vaughan *et al* [102]. De maneira resumida, após exposição do receptor biotinilado à biblioteca de fagos, a proteína com fago ligado foi capturada em pérolas magnéticas revestidas com estreptavidina. Fagos não ligados foram removidos por lavagem. Fagos ligados foram então resgatados como descrito por Vaughan *et al* e repetiu-se o processo de seleção. Realizou-se três ciclos de seleção em concentrações cada vez menores de antígenos. Uma proporção representativa de scFvs do output de ciclos de seleção foi submetida a seqüenciamento de DNA.

Após estas seleções iniciais da biblioteca de apresentação de fago, identificou-se um painel de scFv único em um ensaio de ligação de ligante, que foi projetado para se identificar anticorpos scFv expressando fago que foram capazes de inibir a ligação de GM-CSF a domínio extracelular de GM-CSFR α purificado. A potência de neutralização destes scFv no ensaio de

ligação de ligante compreende de 0,65 a 3,3 nM.

Anticorpos que foram ativos no ensaio bioquímico de ligação de ligante foram avaliados quanto à atividade biológica em um ensaio de proliferação de TF-1, que mediu a potência de neutralização por meio da
5 avaliação da capacidade dos anticorpos de inibirem a proliferação de células TF-1 estimuladas com GM-CSF. TF-1 é uma linhagem de células pré-mielóides humana estabelecida de um paciente com eritroleucemia. Esta linhagem de células é dependente-de-fator para a sobrevivência e a proliferação, e é mantida rotineiramente no GM-CSF humano. A inibição da proliferação
10 dependente de GM-CSF foi determinada medindo-se a redução da incorporação de timidina tritiada no DNA recentemente sintetizado de células que se dividem. Todos os scFv apresentaram potência mensurável neste ensaio, com valores de IC50 abrangendo de cerca de 180 a 1200 nM.

Os clones de scFv mais potentes foram reformatados como
15 moléculas de anticorpos IgG4 humanas com um domínio constante de cadeia pesada gama 4 humana e um domínio constante de cadeia leve lambda humana. Construiu-se vetores para os clones de scFv mais potentes para permitir a expressão dos anticorpos como anticorpo IgG4 integral como descrito por Persic *et al.* [100] com algumas poucas modificações. Incluiu-se
20 um fragmento oriP nos vetores para facilitar o uso com as células HEK-EBNA 293 e para permitir replicação episômica. O domínio variável VH foi clonado no poli-ligante entre a sequência líder de secreção e o domínio constante gama 4 humano do vetor de expressão pEU8.1(+). O domínio variável VL foi clonado no poli-ligante entre a sequência líder de secreção e o
25 domínio constante lambda humano do vetor de expressão pEU4.1(-). Células HEK-EBNA 293 foram co-transfectadas com as construções expressando cadeia pesada e cadeia leve, e anticorpo integral foi purificado do meio condicionado usando-se cromatografia de afinidade de proteína A. As preparações de anticorpo purificadas foram filtradas de forma estéril e

armazenadas a 4°C em solução salina tamponada com fosfato (PBS) antes da avaliação. A concentração de proteína foi determinada medindo-se a absorbância a 280 nm usando-se o método BCA (Pierce).

5 A IgG re-formatada foi comparada com o anticorpo murino conhecido 2B7 no ensaio de proliferação de TF-1. As IgG4s conservaram ou incrementaram atividade neste ensaio, com valores de IC50 compreendendo de 6 a cerca de 1600 nM.

10 Na doença inflamatória, a alteração de forma de neutrófilos é necessária para seu recrutamento no sítio de ação. Projetou-se um ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos para emular esta resposta biológica usando-se separação de células ativada com fluorescência (FACS) para medir a alteração da forma dos granulócitos isolados do sangue após sua exposição a GM-CSF. Avaliou-se a capacidade de anticorpos IgG4 anti-GM-CSFR α em inibir a resposta de alteração de forma de neutrófilos
15 relativamente ao GM-CSF, e valores de IC50 de clones selecionados compreenderam de cerca de 15 a 350 nM. Um anticorpo 28G5 representativo neutralizou GMCSF-R de cynomolgus no ensaio de alteração de forma de granulócitos de cynomologus com um IC50 de cerca de 5 nM. O anticorpo murino conhecido 2B7 também foi capaz de neutralizar a resposta biológica
20 resultante de ligação de GM-CSF com o receptor de cynomolgus.

Em seguida, mediu-se a afinidade de ligação a receptor dos anticorpos usando BIAcore, com valores de K_D calculados compreendendo de 32 a 377 nM.

Otimização

25 Em um esforço para aperfeiçoar a potência de 28G5 iniciou-se um programa de otimização. Produziu-se bibliotecas de anticorpos em que se realizou a mutagênese randômica das CDR3s de V_H ou V_L . Cada CDR3 foi randomizada em dois blocos de 6 aminoácidos para recuperar toda a CDR, produzindo bibliotecas H1 (bloco N-terminal de V_H de CDR3 de 6 aa), H2

(bloco C-terminal de VH de CDR3 de 6 aa), L1 (bloco N-terminal de VL de CDR3 de 6 aa) e L2 (bloco C-terminal de VL de CDR3 de 6 aa). As bibliotecas resultantes foram submetidas a ciclos de seleção repetida para ligação ao GM-CSFR α humano. Clones isolados deste processo de seleção
5 foram usados então para construir uma biblioteca de fago combinada que continha scFv tanto com CDR3s de cadeia pesada mutadas e CDR3s de cadeia leve mutadas. Estas bibliotecas também foram submetidas ao mesmo procedimento de seleção.

Em cada estágio do processo de otimização, scFv que foram
10 capazes de inibir a ligação de IgG4 de 28G5 ao receptor de GM-CSF foram identificados usando-se um ensaio de competição por epítipo com 28G5 e o receptores, e foram então analisados no ensaio de proliferação de TF-1, como descrito abaixo.

Após mutagênese randômica de seqüências CDR3 de cadeia
15 pesada de 28G5, identificou-se um conjunto de scFv com potência de neutralização mensurável no ensaio de TF-1. A maior parte dos melhoramentos de potência foi obtida quando a ponta 3' da VH de CDR3 foi randomizada.

Após mutagênese randômica de seqüências de CDR3 de
20 cadeia leve de 28G5 identificou-se um conjunto de scFv com potência de neutralização mensurável no ensaio de TF-1. Todos os melhoramentos de potência foram obtidos quando a ponta 3' da VL de CDR3 foi randomizada.

Após combinação das bibliotecas de mutagênese randômica de CDR3 de cadeia pesada e cadeia leve, identificou-se um conjunto de scFvs
25 com potência incrementada no ensaio de proliferação de TF-1 relativamente ao scFv de 28G5 parental. ScFv com melhoramentos de potência de >60000 vezes relativamente ao 28G5 parental foram isolados. Todas as combinações das bibliotecas resultaram em scFv melhorado, i.e. H1/L1, H1/L2, H2/L1, H2/L2. Isto é particularmente interessante porque não se isolou scFvs

melhorados da biblioteca de L1.

Um conjunto de 19 scFv identificados durante a otimização de 28G5 foram reformatados e expressos como IgG4s, usando-se os métodos descritos acima. O conjunto constitui-se dos clones de anticorpos 1, 2 e de 4 a 20. Alguns dos clones mais potentes neste conjunto foram obtidos das bibliotecas mutagenizadas de CDR3 H e L combinadas. Os anticorpos IgG4 neste conjunto foram avaliados quanto a sua atividade no ensaio de proliferação de TF-1 e foram comparados com o anticorpo murino conhecido 2B7. Todas as IgG4s otimizadas foram mais potentes do que 2B7 neste ensaio. Nesta ocasião, 2B7 apresentou um IC50 calculado de cerca de 1,6 nM, enquanto que os clones apresentaram valores de IC50 calculados compreendendo de cerca de 1 pM a cerca de 1100 pM. Dados são apresentados na Tabela 1 abaixo e resumidos como a seguir:

IC50 <1500 pM Anticorpos 1, 2 e de 4 a 20
 IC50 <300 pM Anticorpos 1, 2, de 4 a 12 e de 14 a 20
 IC50 <60 pM Anticorpos 1, 2, de 4 a 6, de 8 a 11, 14 e de 16 a 20
 IC50 <10 pM Anticorpos 1, 5, 6, 11 e 20

A Figura 3 ilustra a potência antagonista de dois anticorpos representativos da invenção, Anticorpo 1 e Anticorpo 6, em comparação com o conhecido anticorpo 2B7 no ensaio de proliferação de TF-1.

O sistema BIAcore 2000 (Pharmacia Biosensor) foi usado para avaliar os parâmetros cinéticos da interação de algumas das IgG4s otimizadas para *lead* com domínio extracelular de receptor de GM-CSF marcado com purificação recombinante. A afinidade dos anticorpos foi muito melhorada, com valores K_D calculados de 0,127 nM a cerca de 5 nM. Dados são mostrados na Tabela 2. Obteve-se melhoramentos tanto nas taxas ativas e taxas inativas. A correlação entre a afinidade das IgG4s pelo domínio extracelular solúvel de GM-CSFR α , e seu desempenho no ensaio de TF-1 foi

muito bom, com um coeficiente de Pearson de 0,85 ($p < 0,0001$). A título de comparação, a KD de 2B7 calculada separadamente e mostrada como sendo de cerca de 7 nM.

Anticorpos IgG4 identificados durante a otimização de 28G5 foram avaliados no ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos e foram comparados com o anticorpo murino conhecido 2B7. Todos os anticorpos que foram avaliados neste ensaio (anticorpos 1, 2, 5, 6, de 9 a 11, 16 e 20) se mostraram muito potentes com IC50s compreendendo de 7,8 a 90 pM. Dentre estes, anticorpos 1, 2, 5, 6, 9, 16 e 20 apresentaram IC50s inferiores a 50 pM, e anticorpos 1, 2, 6, 16 e 20 apresentaram IC50s inferiores a 25 pM. Nossos anticorpos foram mais potentes do que 2B7, que apresentaram uma IC50 de 477 pM. Dados são mostrados na Tabela 3. A Figura 4 ilustra a potência antagonista de dois anticorpos representativos da invenção, Anticorpo 1 e Anticorpo 6, em comparação com o conhecido anticorpo 2B7 no ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos.

Anticorpos IgG4 identificados durante a otimização de 28G5 foram avaliados no ensaio de alteração de forma de granulócitos de cynomolgus. Todos os anticorpos foram capazes de neutralizar a atividade de GM-CSF no receptor de cynomolgus e também no receptor de humanos, e todos os anticorpos foram mais potentes do que 2B7. 2B7 apresentou uma IC50 de 26 pM, enquanto que anticorpos representativos (Anticorpo 6, Anticorpo 1 e Anticorpo 2) do conjunto apresentaram valores de IC50 de 1,73, 2,03 e 3,2 pM, respectivamente.

Um conjunto das IgG4s identificadas durante a otimização de 28G5 foi avaliado quanto a sua potência de neutralização no ensaio de liberação de $\text{TNF}\alpha$ de monócitos. Este ensaio testa a capacidade de se inibir a liberação do fator pró-inflamatório $\text{TNF}\alpha$ de monócitos humanos quando eles são tratados com GM-CSF. Anticorpos 1, 2, 5, 6, 9 e 10 foram testados, e todos se mostraram ativos neste ensaio e foram capazes de neutralizar

totalmente a ação do GM-CSF em seu receptor (IC50 compreendendo de cerca de 43 a 139) enquanto que, na concentração de 333 nM, 2B7 só pôde proporcionar 50% de inibição da liberação de TNF α induzida com GM-CSF, indicando que este anticorpo é apenas um inibidor parcial neste ensaio. A

5 Figura 5 ilustra a potência antagonista de dois anticorpos representativos da invenção em comparação com o conhecido anticorpo 2B7 no ensaio de liberação de TNF α de monócitos. Dados são mostrados na Tabela 4 e encontram-se resumidos como a seguir:

<150 pM de Anticorpo nums. 1, 2, 5, 6, 9 e 10

10 <110 pM de Anticorpo nums. 1, 2, 5, 6 e 9

<100 pM de Anticorpo nums. 1, 5, 6 e 61

Uma característica da doença inflamatória é a sobrevida incrementada de tipos de células inflamatórias em resposta a sinais particulares. Granulócitos são capazes de sobreviver durante um tempo mais

15 longo na presença de GM-CSF e, assim, avaliou-se a capacidade dos anticorpos IgG4 isolados durante a otimização de 28G5 para inibir esta resposta, em um ensaio de sobrevida de granulócitos. Todos os IgG4s anti-GM-CSFR α da otimização para *lead* foram ativos neste ensaio, e potências de neutralização representativas (IC50) compreenderam de 7,0 a 843,7 pM. Isto

20 contrasta com o anticorpo murino conhecido 2B7 que foi completamente inativo até uma concentração de 83 nM. A Figura 6 ilustra a potência antagonista de dois anticorpos representativos da invenção, Anticorpo 1 e Anticorpo 6, em comparação com o conhecido anticorpo 2B7 no ensaio de sobrevida de granulócitos.

25 Estes dados, como ilustrado nas Figuras de 3 a 6, indicam que nossos anticorpos apresentam propriedades significativamente diferentes em comparação com o anticorpo murino conhecido 2B7. Por exemplo, anticorpos representativos da invenção inibiram a sobrevida de granulócitos e a proliferação de TF-1 estimulada com 7 pM de GM-CSF na sobrevida de

granulócitos e nos ensaios de proliferação de TF-1, respectivamente, enquanto que 2B7 não inibiu a sobrevivência de granulócitos, mas inibiu a proliferação de TF-1 (embora, em menor grau do que nossos anticorpos). Os dados indicam que elementos de ligação da invenção apresentam maior afinidade e melhor

5 capacidade de inibir uma variedade de efeitos biológicos mediados por meio de GM-CSF-R em comparação com conhecidos anticorpos anti-GM-CSFR α .

As seqüências de aminoácidos derivadas de 28G5 e seus derivados foram alinhadas com as seqüências de linhagem germinal humanas conhecidas no banco de dados VBASE, e a linhagem germinal mais próxima

10 identificada por meio de similaridade de seqüência. A linhagem germinal mais próxima do domínio VH de 28G5 e seus derivados foi identificada como VH1 DP5. A VH de 28G5 apresenta 14 alterações relativamente à linhagem germinal VH 1-24 (DP5) em regiões de estrutura. A linhagem germinal mais próxima do domínio VL é Vlambda1 VL 1-e (DPL8), que apresenta apenas 5

15 alterações com relação à linhagem germinal nas regiões de estrutura. Regiões de estrutura de 28G5 e seus derivados foram retornadas à linhagem germinal por meio de mutagênese dirigida para sítio para equiparar identicamente anticorpos humanos nativos. Todos, exceto um aminoácido, puderam ser convertidos à linhagem germinal com alterações meramente modestas na

20 potência do anticorpo. A isoleucina de aminoácido na posição 94 da cadeia pesada (usando numeração Kabat, Kabat *et al.* 1971) não pôde ser alterada à treonina de linhagem germinal sem uma completa perda de atividade. Portanto, esta alteração simples relativa à linhagem germinal foi mantida na região de estrutura do anticorpo.

25 Uma plena análise de dois dos anticorpos anti-GM-CSFR α , Anticorpo 6 e Anticorpo 1, foi realizada no ensaio de proliferação de TF-1. Os dados confirmam que estes anticorpos constituem antagonistas altamente potentes neste sistema com valores de pA₂ calculados de -11,3 $\pm$ 0,2 e -11,0 $\pm$ 0,2, respectivamente (Figura 1).

Uma análise pA_2 plena de um dos anticorpos anti-GM-CSFR α , Anticorpo 6, foi realizada nos ensaios de alteração de forma de granulócitos de humanos e de cynomolgus. Os dados confirmam que este anticorpo é um antagonista altamente potente nestes sistemas com valores pA_2 calculados de -10,58 e -10,78 nos ensaios de humanos e de cynomolgus, respectivamente (Figura 2).

GM-CSF impele a diferenciação de células progenitoras hemopoiéticas em colônias de granulócitos e macrófagos em ensaios de agar semi-sólido. Portanto, anticorpo 6 e Anticorpo 1 maturados por afinidade, o anticorpo mAb parental 3 (28G5) e um controle negativo (CAT001) foram avaliados quanto a sua capacidade de antagonizar esta atividade específica de GM-CSF usando-se células progenitoras derivadas de sangue periférico, em um ensaio de formação de colônias. Dados apresentados na Figura 7 demonstram que ambos os mAbs representativos maturados por afinidade foram inibidores potentes da formação de colônias hemopoiéticas *in vitro* mediada por GM-CSF humano.

Valores de IC_{50} aproximados foram de 0,08 μ g/ml (Anticorpo 6) e 0,25 μ g/ml (Anticorpo 1) para o mAb maturado por afinidade. É interessante observar que o anticorpo murino conhecido 2B7 pareceu apresentar pouca ou nenhuma atividade inibidora neste ensaio até uma concentração de 66 nM.

Em experimentos de controle, o mAb maturado por afinidade não exerceu efeito sobre a formação de colônia mediada pela combinação de SCF + IL-3 + G-CSF como esperado e, na ausência de citocinas, a formação de colônias foi desprezível (<4 colônias/cultura).

Para a análise *in vivo* da atividade antagonista de mAb específico para huGM-CSFR α , é possível usar transplante de medula óssea de camundongos transgênicos (Tg) expressando ambas as cadeias, α e β , do GM-CSFR humano em camundongos de tipo selvagem, para gerar animais

quiméricos de forma a limitar a expressão de huGM-CSFR transgênico a células hemopoiéticas derivadas de medula óssea células hemopoiéticas e, assim, assemelha-se mais estreitamente ao perfil de expressão do receptor endógeno. Nestes camundongos Tg quiméricos a administração de huGM-CSF leva a um aumento do peso do baço e à marginalização de monócitos circulantes do sangue. Anticorpo 6 maturado por afinidade e um mAb de controle negativo, CAT001, foram avaliados quanto a sua capacidade de antagonizar estas respostas *in vivo* mediadas com GM-CSF. Para a análise dose-resposta, 6 grupos de 5 camundongos Tg quiméricos foram tratados com 500 ng de huGM-CSF s.c duas vezes ao dia durante 4 dias (dia 1-4) e um sétimo grupo de controle de cinco animais recebeu apenas PBS. Quatro dos 6 grupos de animais tratados com huGM-CSF receberam mAb de teste (Anticorpo 6) a 16 mg/kg, 5,3 mg/kg, 1,78 mg/kg ou 0,59 mg/kg no dia 0 [D.0], enquanto que um quinto grupo dos animais tratados com huGM-CSF recebeu CAT001 de controle a 16 mg/kg no dia D.0. Resultados apresentados na Figura 8 demonstram que, em comparação com o controle de PBS, o tratamento com huGM-CSF induziu um aumento significativo do peso do baço e uma diminuição dos monócitos circulantes do sangue. Como esperado, tratamento com 16 mg/kg de controle CAT001 não exerceu qualquer efeito sobre o aumento do peso do baço ou sobre a diminuição dos monócitos do sangue. Em contraste, houve um claro efeito dose-resposta após o tratamento com o mAb de teste, Anticorpo 6, porque a 16 mg/kg este anticorpo anulou o aumento do peso do baço e, embora ainda aparente, o efeito foi muito reduzido a 0,59 mg/kg de mAb. A IC_{50} poderia parecer situar-se em algum ponto entre 0,59 mg/kg e 1,78 mg/kg. Observou-se um resultado similar para a diminuição induzida com GM-CSF em monócitos circulantes - tratamento com mAb de teste, Anticorpo 6, a 16 mg/kg anulou o aumento, enquanto que mAb a 0,59 mg/kg apresentou um impacto meramente menor sobre esta resposta. Estes dados mostram que o anticorpo anti-GM-CSFR α é um

antagonista de GM-CSFR α humano *in vivo*.

Para investigar adicionalmente as propriedades antiinflamatórias destes anticorpos anti-GM-CSFR α , Anticorpo 6 foi avaliada em um ensaio de liberação de citocinas de células mononucleares do sangue periférico. Neste ensaio, TNF α e IL-6 podem ser liberados endogenamente, dependendo do doador. Neste ensaio, o GM-CSF também é produzido endogenamente pelas células, ao invés de adicionado exogenamente, e, portanto, resultados observados neste ensaio representam a inibição dos efeitos biológicos da ligação de GM-CSF endógeno nativo a seu receptor.

Após a administração do anticorpo 6, ambas estas citocinas foram inibidas de forma dependente da dose, como ilustrado na figura 9. Estes dados indicam que estes anticorpos podem inibir a atividade de GM-CSF nativo e que, mediante a inibição da sinalização de GM-CSF, é possível inibir citocinas pró-inflamatórias-chave, como IL-6 e TNF α , sendo que ambos estão implicados numa variedade de indicações inflamatórias, como artrite reumatóide.

Adicionalmente, com base neste resultado com Anticorpo 6 pode-se esperar que cada um dos anticorpos de 1 a 20 também poderia demonstrar a inibição neste ensaio, porque se acredita que todos os anticorpos de 1 a 20 ligam-se à mesma região de GM-CSFR α .

Mapeamento de radicais importantes para o reconhecimento de antígeno, e análise de seqüência

Foi determinado que a variabilidade de radicais em posições na seqüência do scFv de Anticorpo 6 submetido a terapia na linhagem germinal para identificar quais posições são normalmente conservadas para ligação de ligante e sendo que referidas posições são variáveis no anticorpo que ainda conserva atividade de ligação de ligante.

Posições que contribuem para a ligação de antígeno foram verificadas como sendo os radicais Kabat 27A, 27B, 27C, 32, 51, 52, 53, 90,

92 e 96 no domínio VL, e radicais Kabat 17, 34, 54, 57, 95, 97, 99 e 100B no domínio VH.

Identificou-se sete posições que pareceram ser importantes para a ligação de antígeno: H95, H97, H99, H100B, L90, L92 e L96. Nós
5 analisamos então os radicais nestas posições em seqüências de 160 variantes isoladas durante o processo de otimização do anticorpo 28G5, sendo que todas apresentaram um melhoramento mínimo de 5 vezes na potência no ensaio de proliferação de TF-1.

Dados na Tabela 5 abaixo resumem os diferentes aminoácidos
10 (de, possivelmente, 20) que foram observados em cada uma destas posições, e em L95A. Onde as posições são fortemente conservadas com relação aos aminoácidos presentes no 28G5 e/ou Anticorpo 6, isto é boa evidência de que referidos aminoácidos são "chave" para a ligação do antígeno. Por exemplo, os radicais nas posições a seguir são fortemente conservados: H97, H100B,
15 L90, L92.

Método

A seqüência de DNA que codifica o scFv Anticorpo 6 maturado por afinidade e submetida a terapia na linhagem germinal foi convertida ao formato de apresentação de ribossoma, substancialmente como
20 descrito na ref. [101]. Realizou-se PCR propensa a erro na seqüência do Anticorpo 6, usando-se as condições de elevada mutação (7,2 mutações por 1.000 bp [pares de bases]) de acordo com o protocolo do fabricante (BD Bioscience), para criar uma biblioteca de seqüências 574D04 variantes contendo mutações pontuais randômicas. Esta biblioteca foi expressa em
25 ribossomas e incubada com GM-CSFR α marcado com purificação para permitir a ocorrência de ligação. Variantes capazes de se ligarem a GM-CSFR α marcado foram capturadas e removidas usando-se pérolas paramagnéticas revestidas com proteína G (Dynal). As variantes não-ligadas remanescentes na população foram adicionadas a um combinado de quatro

anticorpos anti-idiotípicos biotinilados, que haviam sido derivados previamente da grande biblioteca de apresentação de fago de anticorpos humanos descrita na ref. [102] e que se sabia que se ligam ao scFv Anticorpo 6. Variantes ligadas pelos anticorpos anti-idiotípicos biotinilados foram capturadas com pérolas de estreptavidina, enquanto que variantes não-ligadas foram removidas por lavagem. Este processo foi repetido durante mais dois ciclos de seleção de apresentação de ribossoma, de acordo com a metodologia geral da ref. [101].

Uma proporção representativa de variantes das emissões de seleção foi clonada em um vetor de fagomídeo e as variantes de scFv foram expressas em fago para teste com ELISA, usando-se o mesmo método como descrito em Edwards BM *et al* (2003) *Journal of Molecular Biology*, vol. 334:103. Aquelas variantes que não apresentaram ligação a GM-CSFR α marcado com purificação foram testadas quanto à ligação com o combinado de quatro anticorpos anti-idiotípicos que foram usados na seleção. Variantes, que no ensaio de ligação de anti-idiotipo demonstraram ligação que foi igual ou maior do que o Anticorpo 6 scFv, foram seqüenciadas e as seqüências foram analisadas para encontrar posições em que havia uma elevada freqüência de mutação.

Verificou-se que a taxa média de mutação da população de variantes é de 3,05 aminoácidos por cadeia V_H ou V_L, usando-se 486 seqüências para as cadeias V_H e 451 seqüências para as cadeias V_L. Elas foram analisadas quanto a "pontos quentes" mutacionais, freqüência de plotação de mutação em relação a sua posição ao longo do scFv. A análise focalizou aqueles clones com pelo menos uma mutação de CDR por V_H e V_L e menos de 4 mutações por V_H e V_L. A partir deste conjunto de 123 seqüências V_H e 148 seqüências V_L, "pontos quentes" foram definidos como aqueles que apresentaram uma freqüência mutacional de 5% ou mais.

Sete posições entre V_HCDR3 e V_LCDR3 do Anticorpo 6 foram

salientadas como posições putativas importantes para a ligação de antígeno usando-se o método de seleção negativo de apresentação de ribossoma. Realizou-se então uma análise em 160 variantes de seqüência isoladas durante o processo de otimização do anticorpo 28G5, em que as seqüências inteiras de

5 V_HCDR3 e V_LCDR3 foram randomizadas e selecionadas para maior afinidade. Todas as seqüências (incluindo Anticorpo 6) são variantes do 28G5 que mostraram um melhoramento mínimo de 5 vezes na potência no ensaio de proliferação de TF-1.

Determinação de epitopo linear

10 Foram selecionados o Anticorpo 6 e o conhecido anticorpo 2B7 contra 2442 peptídeos, cada um representando regiões curtas da seqüência de aminoácidos da porção extracelular do GM-CSFR- α , usando-se um método PEPSCAN. Calculou-se a média de sinais de ligação para cada anticorpo contra todos os peptídeos para gerar um sinal de fundo médio, e

15 calculou-se para cada peptídeo uma relação sinal/fundo. Para ambos, Anticorpo 6 e 2B7, uma relação sinal/fundo de quatro ou mais foi contada como um sinal positivo específico. As seqüências de peptídeos que fornecem sinal positivo específico foram analisadas quanto a unidades repetitivas de ligação conservadas e verificou-se que o Anticorpo 6 ligou-se, de preferência,

20 a uma unidade repetitiva YLDFQ, correspondendo aos radicais de 226 a 230 de GM-CSFR α humano maduro, e o 2B7 anticorpo ligou-se, de preferência, a uma unidade repetitiva DVRI, correspondendo aos radicais de 278 a 281 do GM-CSFR α humano maduro. A numeração da seqüência de aminoácidos para o receptor maduro é como apresentada na SEQ ID NO: 206.

25 ***Método PEPSCAN (varredura de ligação de peptídeo)***

A superposição de, na maior parte, peptídeos sintéticos 15-mer apresentando seqüências derivadas de GMCSF foram sintetizadas e selecionadas usando-se cartões mini-PEPSCAN com formato de cartão de crédito (placa de 455 poços com poços de 3 ul) como descrito previamente

[103]. A ligação de anticorpos a cada peptídeo foi testada em um ensaio imunológico ligado a enzima (ELISA) à base de PEPSCAN. Cartões de polipeptídeo com formato de cartão de crédito de 455 poços contendo os peptídeos ligados covalentemente foram incubados com amostra (por exemplo, 10 ug/ml de anticorpo ou soro diluído a 1/1000 em uma solução de PBS que contém 5% de soro de cavalo (v/v) e 5% de ovalbumina (peso/volume)) e 1% de Tween80 ou em case de bloqueio brando em uma solução de PBS com 4% de soro de cavalo (v/v) e 1% de Tween80 (4°C, de um dia para o outro). Após a lavagem, os peptídeos foram incubados com uma peroxidase anti-anticorpo (diluição a 1/1000, por exemplo, peroxidase anti-camundongo de coelho, Dako) (1 h, 25°C), e subseqüentemente, após a lavagem, adicionou-se o substrato de peroxidase sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) e 2 ul/ml de H₂O₂ a 3%. Após 1 hora mediu-se o desenvolvimento de cor. O desenvolvimento de cor do ELISA foi quantificado com uma câmara de CCD e um sistema de processamento de imagem. A montagem consiste de uma câmara CCD e uma lente de 55 mm (Sony CCD Video Camara XC-77RR, Nikon micro-nikkor, lente de 55 mm f/2,8), um adaptador de câmara (Sony Camara adaptor DC-77RR) e o pacote de software de processamento de imagem Optimas, versão 6,5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, E.U.A.). Optimas roda em um sistema de computador Pentium.

Materiais e métodos de ensaio

Ensaio bioquímico de ligação de ligante

Realizou-se preparações de scFv purificado como descrito no Exemplo 3 do W001/66754 [104]. Concentrações de proteína de preparações de scFv purificado foram determinadas usando-se o método BCA [105]. Placas de microtitulação FluoronuncTM de 96 poços foram revestidas de um dia para o outro a 4°C com 50 µl/poço de IgG4 anti-humano diluído a 2,5 µg/ml em PBS. Placas foram lavadas 3 vezes com 300 µl/poço de PBS/0,1%

de Tween-20 antes de bloquear durante 1 hora à temperatura ambiente com 300 µl/poço de 3% de BSA em PBS. Placas foram lavadas novamente 3 vezes com 300 µl/poço de PBS/0,1% de Tween-20 e, depois, adicionou-se 50 µl de GM-CSFRα humano diluído a 62,5 ng/ml em 1% de BSA/PBS em cada poço, e as placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem por 3 vezes como descrito acima, adicionou-se 25 µl de material de amostra em cada poço, seguido de 25 µl de GM-CSF biotinilado diluído a 2 nM em 1% de BSA/PBS. Para definir a ligação total, usou-se tamponador apenas como o material de amostra. Para definir ligação não-específica, usou-se GM-CSF biotinilado a 100 nM em 1% de BSA como o material de amostra. Placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente antes de lavagem por 3 vezes como descrito acima. Adicionou-se 50 µl de estreptavidina marcada com európio (PerkinElmer) diluído a 100 ng/ml em tamponador de ensaio DELFIA™ a cada poço da placa e isto foi incubado durante de 30 a 60 minutos à temperatura ambiente antes de lavar 7 vezes com tamponador de lavagem DELFIA™. Adicionou-se 50 µl/poço de solução de incremento de DELFIA™ às placas e as amostras foram lidas a 615 nm em uma leitora de placas.

Ensaio de proliferação de TF-1

Células TF-1, obtidas da R&D Systems e conservadas rotineiramente em RPMI 1640, 10% de FBS, 1 mM de piruvato de sódio e 4 ng/ml de GM-CSF, foram privadas de nutriente por meio de lavagem por 3 vezes em meio de ensaio (RPMI 1640, 5% de FBS, 1 mM de piruvato de sódio), ressuspensando-se em meio de ensaio e incubando-se durante de 7 a 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Células foram então ressuspensas a 1x10⁵/ml em meio de ensaio e adicionou-se 100 µl em cada poço de uma placa de cultura de tecidos de fundo plano e 96 poços. Amostras de teste foram preparadas por meio de filtração estéril da amostra de estoque antes da diluição em meio de ensaio. Adicionou-se então 50 µl do material de teste em

cada poço de células e estas foram incubadas durante de 45 a 60 min a 37°C em 5% de CO₂. Adicionou-se então, em cada poço, 50 µl de GM-CSF diluído ao valor de EC₈₀ em meio de ensaio (ou 0,4 ng/ml no caso de algumas bateladas de GM-CSF), e as placas foram incubadas durante 16 horas a 37°C em 5% de CO₂ em uma câmara umedecida. Isto representa uma concentração final de 7 pM de GM-CSF. Para medir a proliferação das células, adicionou-se 20 µl de ³H-timidina diluída a 5,0 µCi/ml em meio de ensaio em cada poço da placa e as placas foram incubadas durante 4 horas ± 30 min a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, células foram colhidas em placas 96 poços GF/C Unifilter™ usando-se um colheitador de placas e lavadas. Após adição de 50 µl de MicroScint 20™ em cada poço da placa de filtração, as placas foram fechadas hermeticamente e contadas em uma leitora de placas TopCount.

Ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos

Revestimentos tampão humanos (bolsa de sangue humano do Serviço de Transfusão de Sangue) foram misturados em um volume igual de 3% de Dextrano T-500 em 0,9% de NaCl. Em seguida, a mistura foi incubada numa posição ereta até formar-se uma interface. A camada superior foi colhida e aplicada em forma de camada sobre um gradiente de densidade 1,077 histopaque que, então, foi centrifugado a 400 g durante 40 minutos e deixado parar sem frenagem. As camadas superiores deste gradiente foram removidas deixando o pellet de granulócitos. Quaisquer células sangüíneas vermelhas remanescentes no pellet foram lisadas por meio de ressuspensão das células em 20 ml de água gelada durante 30 s, seguido de adição imediata de cloreto de sódio gelado a 1,8%. Células foram então re-pelotizadas a 1200 rpm e ressuspensas em meio de ensaio (RPMI 1640, 10% de FBS, 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 25 mM de HEPES) a 1x10⁶/ml. Adicionou-se então 100 µl de células em cada poço de uma placa de cultura de tecidos de fundo plano e 96 poços. Preparou-se amostras de teste por meio de filtração estéril das amostras de consumo e diluindo, conforme apropriado,

em meio de ensaio.

Para isolamento de anticorpos *lead*, adicionou-se então 50 µl de amostra de teste às células, e as placas foram incubadas durante de 45 a 60 min a 37°C em 5% de CO₂. Isto representa uma concentração final de 7 pM de GM-CSF. Isto foi seguido da adição de 50 µl de GM-CSF, diluído a 0,4 ng/ml em meio de ensaio, em cada poço, e de uma incubação de 4 horas a 37°C em 5% de CO₂ numa câmara umedecida.

Para otimização para *lead*, IgG4s filtrados diluídos em meio de ensaio foram misturados com um volume igual de GM-CSF a 0,4 ng/ml em meio de ensaio. Isto representa uma concentração final de 7 pM de GM-CSF. Adicionou-se então 100 µl de anticorpo/GM-CSF em cada poço. Isto foi seguido de uma incubação de 3 horas a 37°C em 5% de CO₂ numa câmara umedecida.

Adicionou-se formaldeído frio a uma concentração final de 1,25% e as células foram fixadas de um dia para o outro a 4°C. Analisou-se 2000-5000 eventos por poço com a técnica de citometria de fluxo. A média geométrica do espalhamento direto (FSC) para cada amostra foi então derivada usando CellQuest. Células foram direcionadas de forma a excluir populações irrelevantes (p. ex., fragmentos/células mortas) quando se calcula a média geométrica.

Ensaio de alteração de forma de granulócitos de Cynomolgus

Anticorpos foram avaliados em um ensaio que mede a alteração de forma de granulócitos de cynomolgus após estimulação com GM-CSF. Granulócitos foram purificados de sangue integral de cynomolgus e o ensaio foi realizado substancialmente como descrito para o ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos.

Dados de afinidade de ligação usando análise de biossensor

O sistema BIAcore 2000 System (Pharmacia Biosensor) foi usado para avaliar os parâmetros cinéticos da interação entre scFvs e IgG4s

com os receptores recombinantes. O Biosensor usa os efeitos ópticos da ressonância de plasmon de superfície sobre alterações do estudo na concentração de superfície resultante da interação de uma molécula de um composto a ser analisado com uma molécula de ligante que é ligada covalentemente a uma matriz de dextrano. Tipicamente, a espécie de composto a ser analisado em solução livre é passada sobre o ligante acoplado, e qualquer ligação é detectada como um aumento do sinal de SPR local. Isto é seguido de um período de lavagem, durante o qual a dissociação da espécie de composto a ser analisado é observada como uma diminuição do sinal de SPR, após o que qualquer composto a ser analisado remanescente é extraído do ligante, e o procedimento é repetido com várias concentrações diferentes de composto a ser analisado. Empregou-se usualmente uma série de controles durante um experimento para assegurar que, nem a capacidade de ligação absoluta, nem o perfil cinético do ligante acoplado se alteram significativamente. Usa-se tipicamente uma solução salina proprietária de tamponador de herpes (HBS-EP) como o diluente principal de amostras de composto a ser analisado e solvente de fase de dissociação. Os dados experimentais são registrados em unidades de ressonância (correspondendo diretamente ao sinal de SPR) com relação ao tempo. As unidades de ressonância são diretamente proporcionais ao tamanho e à quantidade de composto a ser analisado ligado. É possível usar então o pacote de programas BIAevaluation para atribuir a constante de taxa à fase de dissociação (unidades de taxa de dissociação s^{-1}) e fase de associação (unidades de taxa de associação $M^{-1} s^{-1}$). Estes valores permitem, então, o cálculo das Constantes de Afinidade de Associação e Dissociação.

Avaliou-se a afinidade de IgG4 usando um ensaio simples em que a IgG4 foi capturada de maneira não-covalente por meio de superfície de proteína A de amina. Uma série de diluições de domínio extracelular de receptor de GM-CSF marcado com purificação recombinante, de 100 a 6,25

nM, foi passada então seqüencialmente sobre o IgG4. Calculou-se a molaridade do receptor usando-se a concentração (Bradford) e a massa predita de polipeptídeo maduro não-modificado após a tradução (39,7 kDa). Cada um dos dois conjuntos de dados separados foi analisado em formatos idênticos.

- 5 Dados corrigidos com relação a células de referência foram submetidos a ajustamento usando-se o modelo de Langmuir a 1:1 ajustado para cálculo global simultâneo das taxas de associação e dissociação, com o valor R_{max} ajustado para global. O nível de IgG4 capturado durante cada ciclo foi avaliado para assegurar que a quantidade capturada permaneceu estável
- 10 durante todo o experimento. Adicionalmente, a taxa de dissociação do IgG4 foi avaliada para determinar se seria necessária uma correção do desvio da linhagem de base. No entanto, ambas as interações de proteína A provaram ser suficientemente reproduzíveis e estáveis. A validade dos dados foi restringida pelo valor T e χ^2 calculado (parâmetro valor/desvio), que
- 15 deveria ser <2 e >100 respectivamente.

Produção de domínio extracelular de GM-CSFR α marcado com purificação:

- Usou-se um vetor de expressão pEFBOS [106] incorporando uma seqüência codificando domínio extracelular α de receptor de GM-CSF humano (SEQ ID NO: 205, representando os aminoácidos de 1 a 298 do GM-
- 20 CSF R maduro) com uma seqüência-sinal de IL-3 de murino e incorporando um marcador de purificação N-terminal, para produzir polipeptídeo de domínio extracelular (ECD) de receptor de GM-CSF marcado N-terminal recombinante. O polipeptídeo de ECD marcado foi expresso em células CHO usando-se o vetor pEFBOS com o uso de procedimentos convencionais. Este
- 25 polipeptídeo também pode ser referido como domínio extracelular de GM-CSFR α purificado, ou como o domínio extracelular solúvel de GM-CSFR α .

É possível usar qualquer marcador de purificação vantajoso, p. ex., peptídeo Flag (DYKDDDE - SEQ ID NO: 204), Fc, biotina ou marcador his. A purificação pode ser conduzida empregando-se qualquer técnica

apropriada, p. ex. um polipeptídeo de ECD marcado com Flag (SEQ ID NO: 203) pode ser purificado em uma coluna de cromatografia de afinidade M2 e eluído com peptídeo FLAG.

Ensaio de liberação de TNF α de monócitos

5 Purificação de Monócitos (Kit de Isolamento de Monócitos – Miltenyi Biotec – 130-053-301):

Revestimentos tampão humanos (bolsa de sangue humano do Serviço de Transfusão de Sangue) foram aplicados em forma de camada sobre um gradiente de densidade 1,077 histopaque (Sigma, número de catálogo
10 1077-1) e células foram centrifugados a 400xg durante 40 minutos. Não se aplicou frenagem ao parar a centrífuga. Em seguida, colheu-se células PBMC da interface. Células foram lavadas em PBS e pelotizadas a 300xg durante 10 min antes que as células sangüíneas vermelhas remanescentes sejam lisadas por meio de ressuspensão em 20 ml de água gelada durante 15 s, seguido de
15 adição imediata de NaCl gelado a 1,8%. Células foram então pelotizadas a 1200 rpm durante 5 min e ressuspensas em 600 μ l de tamponador MACS (PBS, 2 mM de EDTA). Adicionou-se às células 200 μ l de reagente de bloqueio Fc fornecido com o kit e isto foi misturado antes de se adicionar 200 μ l de coquetel de hapteno-anticorpo (também fornecido com o kit) e
20 misturação. Em seguida, células foram incubadas a 4°C durante 15 min antes de serem lavadas duas vezes em 50 ml de tamponador MACS. O pellet de células foi ressuspenso em 600 μ l de tamponador MACS antes de se adicionar 200 μ l de reagente de bloqueio Fc e misturação, seguido de 200 μ l de micro-pérolas anti-hapteno MACS e misturação. As células foram
25 incubadas durante 45 min a 4°C antes de lavagem em 50 ml de tamponador MACS e ressuspensão em 500 μ l de tamponador MACS. Preparou-se uma coluna simples (Miltenyi Biotec 130-042-401) por meio de lavagem de perfusão com 3 ml de tamponador MACS antes que a suspensão de células fosse aplicada na coluna. O efluente foi recolhido como a fração de monócitos

enriquecida. A coluna foi lavada com 2x3ml de tamponador MACS e recolheu-se o efluente. A pureza dos monócitos foi verificada por meio de manchamento com anti-CD14-PE usando-se métodos convencionais de citometria de fluxo. Células foram ressuspensas finalmente a $4 \times 10^6/\text{ml}$ em
 5 meio de ensaio (RPMI 1640, 10% de FCS, 100U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina).

Estimulação de Monócitos:

50 μl de células foram adicionados em cada poço de uma placa de cultura de tecidos de fundo plano Costar com 96 poços. Adicionou-se em
 10 todos os poços 25 μl de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rhIFN γ (R&D Systems). IgG4s filtrados diluídos em meio de ensaio foram misturados com um volume igual de GM-CSF a 56 ng/ml (4 nM) em meio de ensaio. Isto representa uma concentração final de 1 nM de GM-CSF. Adicionou-se então, em cada poço, 75 μl de mistura de anticorpo/GM-CSF. Controles consistiram de poços
 15 carregados apenas com GM-CSF ou sem GM-CSF e sem anticorpo. Placas foram então incubadas durante 18 horas a 37°C com 5% de CO $_2$ numa câmara umedecida. O sobrenadante foi então colhido para testar níveis de TNF- α por meio de ELISA.

ELISA de TNF α (R&D Systems ELISA Developing System DY210):

20 Placas de ELISA imunossorvente Fluoronunc foram revestidas de um dia para o outro à temperatura ambiente com 100 μl de anticorpo de captura a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em PBS. Placas foram então lavadas três vezes com PBS/0,1% de Tween e bloqueadas com 300 μl /poço de Marvel a 3% em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. Placas foram lavadas 3 vezes com
 25 PBS/0,1% de Tween. 100 μl do sobrenadante das placas de ensaio foram transferidos para a placa de ELISA e adicionou-se, nos poços de controle, uma titulação de TNF- α diluído em meio de ensaio. Placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas antes de lavagem de 4 a 5 vezes com PBS/0,1% de Tween. Adicionou-se, em cada poço da placa, 100 μl de

anticorpo de detecção diluído a 300 ng/ml em 1% de Marvel/PBS, e as placas foram incubadas durante mais 2 horas à temperatura ambiente antes de lavagem de 4 a 5 vezes com PBS/0,1% de Tween. Estreptavidina-európio (PerkinElmer 1244-360) foi diluído a 1:1000 em tamponador de ensaio DELFIA (PerkinElmer 4002-0010) e adicionado a 100µl/poço antes de se incubar durante 45 min à temperatura ambiente. Placas foram lavadas então 7 vezes em tamponador de lavagem DELFIA antes da adição de 100 µl/poço de solução de incremento (PerkinElmer 4001-0010) e leitura a 615 nm em uma leitora de placas.

10 ***Ensaio de sobrevivência de granulócitos***

Células foram purificadas de revestimentos tampão humanos como descrito com referência ao ensaio de ativação de neutrófilos (ensaio de alteração de forma), lavadas em meio de ensaio (RPMI-1640 Glutamax, 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina) e ressuspensas a 1×10^6 /ml em meio de ensaio. Adicionou-se 100 µl de células em cada poço de uma placa de cultura de tecidos de fundo plano Costar de 96 poços. Estoques filtrados de anticorpo foram diluídos em meio de ensaio e misturados com um volume igual de GM-CSF a 0,4 ng/ml. Isto representa uma concentração final de 7 pM de GM-CSF. Poços de controle continham apenas meio ou GM-CSF apenas. Adicionou-se então 100 µl da mistura de amostra de teste/GM-CSF em cada poço na placa, e as células foram incubadas durante 68 horas a 37°C/5% de CO₂ numa câmara umedecida. Adicionou-se 20 µl de AlamarBlue em cada poço e as placas foram incubadas durante mais 24 horas a 37°C/5% de CO₂ numa câmara umedecida. Placas foram então lidas a 560 nm e 590 nm em uma leitora de placas.

Análise pA₂ de anticorpos anti-GM-CSFR α no ensaio de proliferação de TF-1 e nos ensaios de alteração de forma de granulócitos de humanos e cynomolgus

A principal ferramenta farmacológica para quantificar a

afinidade de um antagonista competitivo é a análise de Schild. Usando esta abordagem é possível determinar meios independentes do sistema para estimar a afinidade antagonista em um ensaio funcional. O método baseia-se no conceito de que a concentração de antagonista e sua afinidade determina o antagonismo da resposta antagonista. Como o antagonista pode ser quantificado e a concentração do antagonista é conhecida, é possível determinar a afinidade do antagonista. Este antagonista é quantificado medindo-se a relação de concentrações equi-ativas de agonistas, sendo isto medido na presença e na ausência do antagonista, e referido como relações de dose (DR).

Relações de dose podem ser calculadas tomando-se a relação da EC50 do agonista (tipicamente GM-CSF) na ausência do elemento de ligação para a EC50 do agonista na presença de uma concentração simples de elemento de ligação. As relações de dose, expressas como $\log(DR-1)$ podem ser usadas então numa regressão linear no $\log$ [elemento de ligação] para produzir uma regressão de Schild. Assim, para cada concentração de elemento de ligação haverá um valor de DR correspondente; estes são plotados como a regressão de $\log(DR-1)$ relativamente a $\log$ [elemento de ligação]. Se o antagonismo for competitivo, haverá relação linear entre $\log(DR-1)$ e $\log$ [elemento de ligação] de acordo com a equação de Schild, sendo que a equação é como a seguir:

$$\text{Log}(DR-1) = \log [A] - \log K_A$$

Nestas circunstâncias, um valor de zero para a ordenada dará uma interceptação do eixo x em que $\log [a] = \log K_A$. Portanto, a concentração de elemento de ligação que produz um $\log(DR-1) = 0$ será igual ao $\log K_A$, a constante de dissociação de equilíbrio do complexo elemento de ligação - receptor. Esta é uma quantificação independente-do-sistema da afinidade do elemento de ligação que deveria ser precisa para cada sistema celular contendo o receptor.

Como os valores de K_A são obtidos de um gráfico logarítmico, eles são distribuídos log normalmente. O logaritmo negativo desta concentração particular é referido empiricamente como pA_2 , a concentração de antagonista que produz um desvio de duas vezes a curva de resposta da dose de agonista. A potência antagonista pode ser quantificada calculando-se a pA_2 de uma concentração simples de antagonista que produz um valor simples para a relação de dose da equação, sendo que

$$pA_2 = \log (DR-1) - \log[a]$$

$[a]$ = concentração molar de antagonista que torna necessário dobrar a concentração de agonista para elicitar a resposta submáxima original.

DR = a relação de dose é quantificada medindo-se a relação de concentrações equi-ativas de agonista medida na presença e na ausência do antagonista.

pA_2 pode ser calculado a partir dos dados de ensaio dose-resposta.

15 ***Inibição da diferenciação mediada com GM-CSF in vitro, de progenitores de células sanguíneas em um ensaio de formação de colônias***

Células mononucleares do sangue periférico enriquecidas com células progenitoras hemopoiéticas foram obtidas de doadores que sofreram mobilização de células progenitoras e aferese como parte de seu tratamento clínico padrão. Amostras foram re-identificadas e células não foram crio-conservadas antes do uso. 5×10^4 Células mononucleares foram cultivadas em agar semi-sólido [107] na presença de GM-CSF humano a uma concentração final de 10 ng/ml. maBs humanos maturados por afinidade, de teste, e o anticorpo murino conhecido 2B7, foram adicionados às culturas em agar a uma concentração final de 10, 5, 1, 0,5, 0,1 ou 0,05 $\mu\text{g/ml}$. O mAb humano parental 28G5 e um mAb humano de controle negativo equiparado com isótipo, CAT001, foram avaliados a uma concentração simples de 10 $\mu\text{g/ml}$. Para fins de controle, mAbs também foram avaliados quanto a sua

capacidade de bloquear a formação de colônias estimuladas por uma combinação de SCF, IL-3 e G-CSF (Crocker *et al.*, 2004) e quanto a seu impacto sobre a formação de colônias na ausência de citocinas. A formação de colônias (agregados > 40 células) foi incrementada após 14 dias de incubação a 37°C com 10% de CO₂ em ar. Colônias foram fixadas com glutaraldeído e contadas usando-se um microscópio de dissecação com um aumento de 35X78

Inibição da atividade biológica do GM-CSF in vivo em camundongos transgênicos GM-CSFR $\alpha\beta$ humanos

Gerou-se camundongos transgênicos (Tg) expressando ambas as cadeias, α e β , do GM-CSFR humano sob o controle de um promotor de MHC de classe I, e descreveu-se respostas de células sangüíneas e de baço *in vivo* à administração de huGM-CSF [108]. Para análise *in vivo* da atividade antagonista de mAb específica para huGM-CSFR α , é possível usar transplante de medula óssea dos camundongos Tg em camundongos de tipo selvagem para gerar animais quiméricos de tal forma que a expressão de huGM-CSFR $\alpha\beta$ transgênico se limite a células hemopoiéticas derivadas de medula óssea e, assim, assemelha-se mais estreitamente ao perfil de expressão do receptor endógeno. Nestes camundongos Tg huGM-CSFR $\alpha\beta$ quiméricos, a administração de huGM-CSF leva a um aumento do peso do baço e à marginalização de monócitos circulantes do sangue.

Geração de camundongos Tg quiméricos:

Fêmures e tíbias de camundongos Tg doadores foram removidos, e a medula óssea foi enxaguada com PBS estéril mais 3% de soro de bezerro fetal (FCS). Em seguida, os tampões de medula óssea foram sugados através de uma agulha 23G para se obter uma suspensão de células simples, depois células foram lavadas uma vez com PBS frio + 3% de FCS e passados através de uma tela de aço inoxidável. Removeu-se então células vermelhas por meio de lise em 0,168 M de tamponador de cloreto de amônio,

após o que células foram lavadas mais duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) + 3% de FCS antes de serem passadas novamente através de uma tela de aço inoxidável. Para remover ainda mais células mortas e fragmentos de células, a suspensão foi centrifugada através de um leito de FCS. Células viáveis são recuperadas no pellet, lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em PBS a $2,5 \times 10^7$ /ml. Camundongos C57/BL6 recipientes com de 5 a 8 semanas de vida foram irradiados letalmente com 2 doses de 550 Rad, com intervalo de 3 horas. Camundongos recipientes foram injetados intravenosamente (i.v) com 0,2 ml de suspensão de células (i.e. 5×10^6 células/camundongo) e alojados subsequentemente em caixas cobertas com 0,02 M de neomicina em sua água potável durante 3 semanas. A reconstituição foi avaliada após 6 semanas por meio de análise de FACS de sangue periférico usando-se mAbs específicos para as cadeias huGMCSFR α e β 79

15 Tratamento com GM-CSF e análise subsequente de camundongos Tg quiméricos:

Camundongos Tg quiméricos foram tratados duas vezes ao dia pela via subcutânea (s.c.) com 500 ng de huGM-CSF durante 4 dias. Para análise da atividade antagonista do anticorpo, grupos de 5 camundongos receberam administração de doses selecionadas de mAb (ver abaixo) pela via intraperitoneal (i.p.) 1 dia antes do início do tratamento com GM-CSF. No dia 5, retirou-se amostras de 0,2 ml de sangue para análise de populações de leucócitos circulantes, em particular monócitos do sangue, usando um sistema de hematologia ADVIA™ (Bayer Diagnostics). Animais foram então sacrificados, e os baços removidos para medição dos pesos.

Inibição de IL-6 e TNF α expresso endogenamente de células mononucleares de sangue periférico humano.

Revestimentos tampão humanos (bolsa de sangue humano do Serviço de Transfusão de Sangue) foram aplicados em forma de camada sobre

um gradiente de densidade de densidade 1,077 de histopaque (Sigma, número de catálogo 1077-1) e células foram centrifugadas a 400xg durante 40 minutos. Não se aplicou frenagem quando da parada da centrífuga. Células PBMC foram então colhidas da interface. Células foram lavadas em PBS e
5 pelotizadas a 300xg durante 10 min antes que as células sangüíneas vermelhas remanescentes fossem lisadas por meio de ressuspensão em 20 ml de água gelada durante 15 s, seguido da adição imediata de NaCl gelado a 1,6%. Células foram então pelotizadas a 1200 rpm durante 5 min e ressuspensas em 10 ml de 10% de FBS/RPMI e 1% de penicilina
10 estreptomicina. Células foram então diluídas a 5×10^6 /ml. 110 μ l de células foram aplicados em cada poço ($5,5 \times 10^5$ /poço) e células foram deixadas assentarem durante 1 h a 37°C, 5% de CO₂. Adicionou-se os seguintes reagentes como controles de concentração final simples; PHA (5 μ g/ml), LPS (25 μ g/ml), GM-CSF (10 ng/ml) e isótipo de controle (50 μ g/ml).
15 Anticorpo 6 foi adicionado a uma concentração de partida final de 50 μ g/ml com uma série de diluição de cinco vezes. Placas foram incubadas então durante 72 h a 37°C, 5% de CO₂. Sobrenadantes foram recolhidos após 72 h, e os níveis de TNFa e IL-6 foram calculados usando-se os seguintes kits de ELISA R&D (hTNF-a R&D Duoset ELISA development
20 system DY210 e hIL-6 R&D Duoset ELISA development system DY206). ELISA foram realizados de acordo com as recomendações dos fornecedores.

Tabela 1: Inibição da proliferação induzida com GM-CSF de células TF-1 por meio de anticorpos IgG4 não-submetidos a terapia na linhagem germinal isolados a partir da otimização de 28G5. A proliferação de
25 células TF-1 foi induzida com uma concentração simples de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de anticorpos IgG4. Mediu-se a incorporação de timidina tritiada, e calculou-se os valores de IC50 para os anticorpos. Dados são representativos de $n \geq 3$, SEM [erro padrão da média, EPM] é mostrado.

IgG4	IC50 $\pm$ SEM (pM)
2B7	1575 $\pm$ 490,5
anticorpo 1	5,3 $\pm$ 0,33
anticorpo 2	15,0 $\pm$ 4,71
anticorpo 4	48,0 $\pm$ 8,33
anticorpo 5	9,3 $\pm$ 5,39
anticorpo 6	0,97 $\pm$ 0,033
anticorpo 7	93,8 $\pm$ 24,6
anticorpo 8	34,5 $\pm$ 2,63
anticorpo 9	40,8 $\pm$ 7,15
anticorpo 10	55,3 $\pm$ 3,73
anticorpo 11	9,0 $\pm$ 1,0
anticorpo 12	246,3 $\pm$ 19,8
anticorpo 13	1106,0 $\pm$ 174,9
anticorpo 14	16,3 $\pm$ 4,9
anticorpo 15	163,8 $\pm$ 7,3
anticorpo 16	12,8 $\pm$ 3,3
anticorpo 17	14,3 $\pm$ 2,8
anticorpo 18	13,3 $\pm$ 3,4
anticorpo 19	23,8 $\pm$ 4,3
anticorpo 20	9,8 $\pm$ 2,8

Tabela 2: Análise cinética de anticorpos IgG4 não-submetidos a terapia na linhagem germinal anti-GM-CSFR α isolados durante a otimização de 28G5. Anticorpos IgG4 foram imobilizados na superfície de um chip revestido com proteína A e uma série de diluições de GM-CSF R α ECD marcado com 5 purificação foram passados sobre a IgG4. Dados foram submetidos ao ajuste usando-se a Langmuir 1:1 simultânea k_a k_d com permissão de transporte de massa.

IgG4	KD (nM)
anticorpo 1	0,264
anticorpo 2	0,376
anticorpo 4	4,07
anticorpo 5	0,847
anticorpo 6	0,139
anticorpo 7	3,93
anticorpo 8	0,552
anticorpo 10	1,50
anticorpo 12	3,02
anticorpo 14	0,502
anticorpo 15	1,03
anticorpo 16	1,14
anticorpo 17	0,193
anticorpo 19	0,388
anticorpo 20	0,127

Dados para anticorpos 9 e 11 foram bifásicos

Tabela 3: Inibição da alteração de forma induzida com GM-CSF de granulócitos humanos por meio de anticorpos IgG4 não-submetidos a terapia na linhagem germinal isolados durante a otimização de 28G5. Granulócitos humanos foram tratados com uma concentração simples de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de anticorpo IgG4. A alteração de forma dos granulócitos foi medida usando-se citometria de fluxo e calculou-se os valores de IC50 para os anticorpos.

IgG4	IC50 ± SD (pM)
2B7	477±491
anticorpo 1	12,6±8,0
anticorpo 2	20,7±11,0
anticorpo 5	30,0
anticorpo 6	13,3±11,8
anticorpo 9	44,0
anticorpo 10	62,0
anticorpo 11	90,0
anticorpo 16	16,0
anticorpo 20	7,8

Tabela 4: Inibição da liberação induzida com GM-CSF de TNF α de monócitos. Monócitos humanos foram tratados com uma concentração simples de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de anticorpo IgG4 não-submetidos a terapia na linhagem germinal. A liberação de TNF α foi medida com ELISA e calculou-se os valores de IC50 para os anticorpos.

IgG4	IC50 ± SD (pM)
anticorpo 1	78,8±54,6
anticorpo 2	103,3±63,1
anticorpo 5	67,0
anticorpo 6	43,0±19,7
anticorpo 9	74,0
anticorpo 10	139,0

Chave para a listagem de seqüências

Na listagem de seqüências anexa encontram-se listadas seqüências de ácido nucleico e aminoácidos ("PRT") para 20 clones de anticorpo, compreendendo o clone parental e os 19 clones do conjunto otimizado. Anticorpos são numerados de Ab1 a Ab20. O clone parental é anticorpo 3, representado pelas SEQ ID NOS: de 21 a 30 e SEQ ID NOS: de 211 a 212.

A lista a seguir identifica, por número, as SEQ ID NOS em que se mostra seqüências das moléculas indicadas:

10	1	Anticorpo 01 VH nt	129	Anticorpo 13 CDR2 VL aa
	2	Anticorpo 01 VH aa	130	Anticorpo 13 CDR3 VL aa
	3	Anticorpo 01 CDR1 VH aa	131	Anticorpo 14 VH nt
	4	Anticorpo 01 CDR2 VH aa	132	Anticorpo 14 VH aa
	5	Anticorpo 01 CDR3 VH aa	133	Anticorpo 14 CDR1 VH aa
15	6	Anticorpo 01 VL nt	134	Anticorpo 14 CDR2 VH aa
	7	Anticorpo 01 VL aa	135	Anticorpo 14 CDR3 VH aa
	8	Anticorpo 01 CDR1 VL aa	136	Anticorpo 14 VL nt
	9	Anticorpo 01 CDR2 VL aa	137	Anticorpo 14 VL aa
	10	Anticorpo 01 CDR3 VL aa	138	Anticorpo 14 CDR1 VL aa
20	11	Anticorpo 02 VH nt	139	Anticorpo 14 CDR2 VL aa
	12	Anticorpo 02 VH aa	140	Anticorpo 14 CDR3 VL aa
	13	Anticorpo 02 CDR1 VH aa	141	Anticorpo 15 VH nt
	14	Anticorpo 02 CDR2 VH aa	142	Anticorpo 15 VH aa
	15	Anticorpo 02 CDR3 VH aa	143	Anticorpo 15 CDR1 VH aa
25	16	Anticorpo 02 VL nt	144	Anticorpo 15 CDR2 VH aa
	17	Anticorpo 02 VL aa	145	Anticorpo 15 CDR3 VH aa
	18	Anticorpo 02 CDR1 VL aa	146	Anticorpo 15 VL nt
	19	Anticorpo 02 CDR2 VL aa	147	Anticorpo 15 VL aa
	20	Anticorpo 02 CDR3 VL aa	148	Anticorpo 15 CDR1 VL aa
30	21	Anticorpo 03 VH nt	149	Anticorpo 15 CDR2 VL aa
	22	Anticorpo 03 VH aa	150	Anticorpo 15 CDR3 VL aa
	23	Anticorpo 03 CDR1 VH aa	151	Anticorpo 16 VH nt
	24	Anticorpo 03 CDR2 VH aa	152	Anticorpo 16 VH aa
	25	Anticorpo 03 CDR3 VH aa	153	Anticorpo 16 CDR1 VH aa
35	26	Anticorpo 03 VL nt	154	Anticorpo 16 CDR2 VH aa
	27	Anticorpo 03 VL aa	155	Anticorpo 16 CDR3 VH aa
	28	Anticorpo 03 CDR1 VL aa	156	Anticorpo 16 VL nt
	29	Anticorpo 03 CDR2 VL aa	157	Anticorpo 16 VL aa
	30	Anticorpo 03 CDR3 VL aa	158	Anticorpo 16 CDR1 VL aa
40	31	Anticorpo 04 VH nt	159	Anticorpo 16 CDR2 VL aa
	32	Anticorpo 04 VH aa	160	Anticorpo 16 CDR3 VL aa
	33	Anticorpo 04 CDR1 VH aa	161	Anticorpo 17 VH nt
	34	Anticorpo 04 CDR2 VH aa	162	Anticorpo 17 VH aa
	35	Anticorpo 04 CDR3 VH aa	163	Anticorpo 17 CDR1 VH aa
45	36	Anticorpo 04 VL nt	164	Anticorpo 17 CDR2 VH aa

	37	Anticorpo 04 VL aa	165	Anticorpo 17 CDR3 VH aa
	38	Anticorpo 04 CDR1 VL aa	166	Anticorpo 17 VL nt
	39	Anticorpo 04 CDR2 VL aa	167	Anticorpo 17 VL aa
	40	Anticorpo 04 CDR3 VL aa	168	Anticorpo 17 CDR1 VL aa
5	41	Anticorpo 05 VH nt	169	Anticorpo 17 CDR2 VL aa
	42	Anticorpo 05 VH aa	170	Anticorpo 17 CDR3 VL aa
	43	Anticorpo 05 CDR1 VH aa	171	Anticorpo 18 VH nt
	44	Anticorpo 05 CDR2 VH aa	172	Anticorpo 18 VH aa
	45	Anticorpo 05 CDR3 VH aa	173	Anticorpo 18 CDR1 VH aa
10	46	Anticorpo 05 VL nt	174	Anticorpo 18 CDR2 VH aa
	47	Anticorpo 05 VL aa	175	Anticorpo 18 CDR3 VH aa
	48	Anticorpo 05 CDR1 VL aa	176	Anticorpo 18 VL nt
	49	Anticorpo 05 CDR2 VL aa	177	Anticorpo 18 VL aa
	50	Anticorpo 05 CDR3 VL aa	178	Anticorpo 18 CDR1 VL aa
15	51	Anticorpo 06 VH nt	179	Anticorpo 18 CDR2 VL aa
	52	Anticorpo 06 VH aa	180	Anticorpo 18 CDR3 VL aa
	53	Anticorpo 06 CDR1 VH aa	181	Anticorpo 19 VH nt
	54	Anticorpo 06 CDR2 VH aa	182	Anticorpo 19 VH aa
	55	Anticorpo 06 CDR3 VH aa	183	Anticorpo 19 CDR1 VH aa
20	56	Anticorpo 06 VL nt	184	Anticorpo 19 CDR2 VH aa
	57	Anticorpo 06 VL aa	185	Anticorpo 19 CDR3 VH aa
	58	Anticorpo 06 CDR1 VL aa	186	Anticorpo 19 VL nt
	59	Anticorpo 06 CDR2 VL aa	187	Anticorpo 19 VL aa
	60	Anticorpo 06 CDR3 VL aa	188	Anticorpo 19 CDR1 VL aa
25	61	Anticorpo 07 VH nt	189	Anticorpo 19 CDR2 VL aa
	62	Anticorpo 07 VH aa	190	Anticorpo 19 CDR3 VL aa
	63	Anticorpo 07 CDR1 VH aa	191	Anticorpo 20 VH nt
	64	Anticorpo 07 CDR2 VH aa	192	Anticorpo 20 VH aa
	65	Anticorpo 07 CDR3 VH aa	193	Anticorpo 20 CDR1 VH aa
30	66	Anticorpo 07 VL nt	194	Anticorpo 20 CDR2 VH aa
	67	Anticorpo 07 VL aa	195	Anticorpo 20 CDR3 VH aa
	68	Anticorpo 07 CDR1 VL aa	196	Anticorpo 20 VL nt
	69	Anticorpo 07 CDR2 VL aa	197	Anticorpo 20 VL aa
	70	Anticorpo 07 CDR3 VL aa	198	Anticorpo 20 CDR1 VL aa
35	71	Anticorpo 08 VH nt	199	Anticorpo 20 CDR2 VL aa
	72	Anticorpo 08 VH aa	200	Anticorpo 20 CDR3 VL aa
	73	Anticorpo 08 CDR1 VH aa	201	seqüência de radical linear de GM-CSFR α
40	74	Anticorpo 08 CDR2 VH aa	202	seqüência de aminoácidos de comprimento pleno de GM-CSFR α humano
	75	Anticorpo 08 CDR3 VH aa	203	domínio extracelular de GM-CSFR α humano marcado com FLAG
	76	Anticorpo 08 VL nt	204	peptídeo FLAG
45	77	Anticorpo 08 VL aa	205	seqüência de aminoácidos do domínio extracelular de GM-CSFR α humano
	78	Anticorpo 08 CDR1 VL aa	206	GM-CSFR α maduro
	79	Anticorpo 08 CDR2 VL aa	207	Anticorpo 1 VL nt
	80	Anticorpo 08 CDR3 VL aa	208	Anticorpo 1 VL aa
50	81	Anticorpo 09 VH nt	209	Anticorpo 2 VL nt
	82	Anticorpo 09 VH aa	210	Anticorpo 2 VL aa

	83	Anticorpo 09 CDR1 VH aa	211	Anticorpo 3 VL nt
	84	Anticorpo 09 CDR2 VH aa	212	Anticorpo 3 VL aa
	85	Anticorpo 09 CDR3 VH aa	213	Anticorpo 4 VL nt
	86	Anticorpo 09 VL nt	214	Anticorpo 4 VL aa
5	87	Anticorpo 09 VL aa	215	Anticorpo 5 VL nt
	88	Anticorpo 09 CDR1 VL aa	216	Anticorpo 5 VL aa
	89	Anticorpo 09 CDR2 VL aa	217	Anticorpo 6 VL nt
	90	Anticorpo 09 CDR3 VL aa	218	Anticorpo 6 VL aa
	91	Anticorpo 10 VH nt	219	Anticorpo 7 VL nt
10	92	Anticorpo 10 VH aa	220	Anticorpo 7 VL aa
	93	Anticorpo 10 CDR1 VH aa	221	Anticorpo 8 VL nt
	94	Anticorpo 10 CDR2 VH aa	222	Anticorpo 8 VL aa
	95	Anticorpo 10 CDR3 VH aa	223	Anticorpo 9 VL nt
	96	Anticorpo 10 VL nt	224	Anticorpo 9 VL aa
15	97	Anticorpo 10 VL aa	225	Anticorpo 10 VL nt
	98	Anticorpo 10 CDR1 VL aa	226	Anticorpo 10 VL aa
	99	Anticorpo 10 CDR2 VL aa	227	Anticorpo 11 VL nt
	100	Anticorpo 10 CDR3 VL aa	228	Anticorpo 11 VL aa
	101	Anticorpo 11 VH nt	229	Anticorpo 12 VL nt
20	102	Anticorpo 11 Vaa	230	Anticorpo 12 VL aa
	103	Anticorpo 11 CDR1 VH aa	231	Anticorpo 13 VL nt
	104	Anticorpo 11 CDR2 VH aa	232	Anticorpo 13 VL aa
	105	Anticorpo 11 CDR3 VH aa	233	Anticorpo 14 VL nt
	106	Anticorpo 11 VL nt	234	Anticorpo 14 VL aa
25	107	Anticorpo 11 VL aa	235	Anticorpo 15 VL nt
	108	Anticorpo 11 CDR1 VL aa	236	Anticorpo 15 VL aa
	109	Anticorpo 11 CDR2 VL aa	237	Anticorpo 16 VL nt
	110	Anticorpo 11 CDR3 VL aa	238	Anticorpo 16 VL aa
	111	Anticorpo 12 VH nt	239	Anticorpo 17 VL nt
30	112	Anticorpo 12 VH aa	240	Anticorpo 17 VL aa
	113	Anticorpo 12 CDR1 VH aa	241	Anticorpo 18 VL nt
	114	Anticorpo 12 CDR2 VH aa	242	Anticorpo 18 VL aa
	115	Anticorpo 12 CDR3 VH aa	243	Anticorpo 19 VL nt
	116	Anticorpo 12 VL nt	244	Anticorpo 19 VL aa
35	117	Anticorpo 12 VL aa	245	Anticorpo 20 VL nt
	118	Anticorpo 12 CDR1 VL aa	246	Anticorpo 20 VL aa
	119	Anticorpo 12 CDR2 VL aa	247	Anticorpo 6 VH nt
	120	Anticorpo 12 CDR3 VL aa	248	Anticorpo 6 VH aa
	121	Anticorpo 13 VH nt	249	Anticorpo 6 VL nt
40	122	Anticorpo 13 VH aa	250	Anticorpo 6 VL aa
	123	Anticorpo 13 CDR1 VH aa	251	VH FR1 aa
	124	Anticorpo 13 CDR2 VH aa	252	VH FR2 aa
	125	Anticorpo 13 CDR3 VH aa	253	VH FR3 aa
	126	Anticorpo 13 VL nt	254	VH FR4 aa
45	127	Anticorpo 13 VL aa	255	VL FR1 aa
	128	Anticorpo 13 CDR1 VL aa	256	VL FR2 aa
			257	VL FR3 aa
			258	VL FR4 aa

As seqüências de nucleotídeos de domínio VL de anticorpos

50 de 1 a 20 não incluem o códon gcg mostrado na ponta 3' nas SEQ ID NOS: 6,

16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186 e 196. Correspondentemente, as seqüências de aminoácidos de domínio VL não incluem o radical Ala C-terminal (resíduo 113) nas SEQ ID NOS: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187 e 197, respectivamente. O radical Ala113 e códon gcg correspondente não foram expressos nos Anticorpos de 1 a 20. uma comparação das seqüências escritas com segmentos de genes de linhagem germinal, particularmente JL2, indica que o radical Ala e códon gcg correspondente não formam parte do domínio VL90

O radical Gly na posição 112 esteve presente nas seqüências scFv e IgG expressas. No entanto, este radical não está presente nas seqüências de segmento j de linhagem germinal humana que formam a região de estrutura 4 do domínio VL, p. ex. JL2. O radical Gly não é considerado como uma parte do domínio VL.

Para expressar a cadeia leve da IgG, proporcionou-se uma seqüência de nucleotídeos codificando a cadeia leve do anticorpo, compreendendo um primeiro éxon codificando o domínio VL, um segundo éxon codificando o domínio CL, e um íntron separando o primeiro éxon e o segundo éxon. Em circunstâncias normais, o íntron é recortado por meio de equipamento de processamento de mRNA celular, conjugando-se a ponta 3' do primeiro éxon com a ponta 5' do segundo éxon. Assim, quando DNA apresentando a referida seqüência de nucleotídeos foi expresso como RNA, o primeiro e segundo éxons foram recompostos. Tradução do RNA recomposto produz um polipeptídeo compreendendo o domínio VL e o domínio CL. Após recomposição, o Gly na posição 112 é codificado pela última base (g) da seqüência de estrutura 4 de domínio VL e as primeiras duas bases (gt) do domínio CL.

As seqüências de domínio VL dos Anticorpos de 1 a 20 são as SEQ ID NOS: de 186 a 246 como indicado acima. As seqüências de

nucleotídeos de domínio VL terminam com cta como o códon final, e Leu é o radical de aminoácido final nas seqüências de aminoácidos de domínio VL correspondentes.

Seqüências de domínio VL e domínio VH não-submetidas a terapia na linhagem germinal de Anticorpo 6 são mostradas nas SEQ ID NOS: de 247 a 250, adicionalmente às seqüências de domínio VL e de domínio VH submetidas a terapia na linhagem germinal mostradas nas SEQ ID NOS: 51, 52, 56, 57, 216 e 217.

Referências

- 10 Todos os documentos mencionados aqui, nesta descrição, são incorporados aqui por referência.
- 1 Haman *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **274**(48):34155-34163 1999
- 2 Nicola NA; Wycherley A; Boyd AW; Layton JE; Cary D; Metcalf D
- 15 Blood, 82(6) p1724-31 (1993)
- 3 Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991)
- 4 Chadd HE and Chamow SM (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194
- 5 Andersen DC and Krummen L (2002) *Current Opinion in*
- 20 *Biotechnology* 13: 117
- 6 Larrick JW and Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418
- 7 Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 25 8 Ausubel *et al.* eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 4th edition 1999
- 9 Wold, *et al.* *Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics – Mathematics and Statistics in Chemistry* (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel

- Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)
- 10 Norman *et al.* Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (April 1998) ISBN: 0471170828
- 11 Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in
5 Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847
- 12 Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089
- 13 Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine
10 Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525
- 14 Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N.. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug
15 Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8
- 16 Chothia C. *et al.* Journal Molecular Biology (1992) 227, 799-817
- 17 Al-Lazikani, *et al.* Journal Molecular Biology (1997) 273(4), 927-948
- 18 Chothia, *et al.* Science, 223,755-758 (1986)
- 19 Whitelegg, N.R.u. and Rees, A.R (2000). Prot. Eng., 12, 815-824
- 20 20 Guex, N. and Peitsch, M.C. Electrophoresis (1997) 18, 2714-2723
- 21 Voet & Voet, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley) 1995.
- 22 Marks *et al Bio/Technology*, 1992, 10:779-783
- 23 Kay, B.K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press.
- 25 24 Stemmer, Nature, 1994, 370:389-391
- 25 Gram *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:3576-3580
- 26 Barbas *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:3809-3813
- 27 Schier *et al.*, 1996, J. Mol. Biol. 263:551-567
- 28 Ledermann J.A. *et al.* (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664

- 29 Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922
- 30 Robinson, J. R. ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- 5 31 Ritz, S. A., M. J. Cundall, et al. (2002). Am J Respir Cell Mol Biol 27(4): 428-35.
- 32 Ritz, S. A., M. R. Stampfli, et al. (2002). Trends Immunol 23(8): 396-402.
- 33 Wooley, K.L., et al. (1995). *Am J Respir Crit Care Med*, **151**, 1915-24.
- 10 34 Kotsimbos, A. T., M. Humbert, et al. (1997). J Allergy Clin Immunol 99(5): 666-72.
- 35 Yamashita N. *et al.*, Cell. Immunol 2002 oct; 219(2); 92-97
- 36 Ohta K., *et al.* J Allergy Clin Immunol. 1999 Nov; 104(5): 1024-30
- 37 Stampfli, M. R., R. E. Wiley, et al. (1998). J Clin Invest 102(9): 1704-14.
- 15 38 Cates, E. C., B. U. Gajewska, et al. (2003). J Allergy Clin Immunol 111(5): 1076-86.
- 39 Campbell, I.K., et. Al. (1997) *Annal Res Dis*, 56, 364-368.
- 39 *Cet al.* (1997) *Annal Res Dis*, **56**, 364-368.
- 20 40 Bischof, R.J., D. Zafiroopoulos, J.A. Hamilton and I.K. Campbell (2000) *Clin Exp Immunol*, **119**, 361-367.
- 41 Campbell, I. K., M. J. Rich, et al. (1998). J Immunol 161(7): 3639-44.
- 42 Hamilton, J. A. (2002). Trends Immunol 23(8): 403-8.
- 43 Yang, Y.H. and J.A. Hamilton (2001) *Arthritis Rheumatol*, **44**, 111-119
- 25 44 Cook, A. D., E. L. Braine, et al. (2001). Arthritis Res 3(5): 293-8.
- 45 Field, M. and L. Clinton (1993). The Lancet 342: 1244.
- 46 Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. 1990 J. Immunol may 1; 144(9): 3347-53
- 47 Leizer T, *et al.* 1990 Blood 1990 Nov 15; 76(10): 1989-96

- 48 Fiehn C, *et al.*, Z Rheumatol 1992 May-Jun; 51 (3): 1221-126
- 49 de Vries, E.G., *et al.* (1991) *Lancet*, **338**, 517-518.
- 50 Hazenberg BP, *et al.* Blood 1989 Dec; 74(8): 2769-70
- 51 Barnes and Hansel (2004). *Lancet*, 364:985-96.
- 5 52 Barnes, P.J. (2000). *Chest*, 117:10S-14S
- 53 McManus, T. E., *et al* (2005) American Thoracic Society Meeting, May 2005.
- 54 Vlahos, R., *et al.* (2005). "GM-CSF is a key pathogenic mediator in experimental COPD." European Respiratory Society Meeting, Sept 2005
- 10 55 McQualter JL, *et al.* (2001) *J Exp Med.* 194: 873-82
- 56 Bagby GC Jr, *et al.* 1988 *J Clin Invest.* 4: 1430-6.
- 57 Estrov Z, *et al.* (1986) *Cancer Res.* 46: 6456-61.
- 58 Barak Y, *et al.* 1981 *Am J Hematol.* 10: 269-75.
- 59 Gualtieri RJ, *et al.* 1988 *Exp Hematol.* 16:613-9.
- 15 60 Suda T, *et al.* 1982 *Leuk Res.* 6: 43-53.
- 61 Gualtieri RJ, *et al.* 1989 *Blood.* 74: 2360-7
- 62 Largaespada DA, *et al.* (1996) Nat. Genet. **12**: 137-43
- 63 Iversen, P. O., *et al.* (1997). *Blood* 90(12): 4910-7.
- 64 Wang *et al.*, 1994 *Exp mol Pathol*
- 20 65 Plenz *et al.*, *Art. Thrombosis and Vascular biology* 1997
- 66 Takashi *et al.*, 1996 *Circulation* 93, 1185-1193
- 67 Biwa T *et al.*, *JBC* 1998 273: 28305-28313
- 68 Makheja *et al.*, *Atherosclerosis* 1989, 76 155-661
- 69 Naito *et al.*, 1992 *J Nutri sci Vitamin* 38: 255-264
- 25 70 Hayashi *et al.*, *Atherosclerosis* 1991 91: 107-116
- 71 Villa *et al* 1994 *J Clin Invest* 93: 1243
- 72 Van Put DJ *et al.*, 1995 *Eur J Pharmacol* 294: 753-761
- 73 Voisard *et al.*, 1994 *Int J Cardiol* 43: 257-267
- 74 Yamada *et al.*, 1993: *Artery* 20: 253-267

- 75 Sakai et al., 1999 *Arterioscler Thromb vasc biol* 19: 1726-1733
- 76 Gearing, et al. *EMBO J.* **8** (12): 3667-3676 (1989)
- 77 Crosier, K. *et al. PNAS* **88**:7744-7748 1991
- 78 Raines, M. *et al. PNAS* **88**:8203-8207 1991
- 5 79 Wess, L. In: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*,
12(42), A1-A7, 2004
- 80 Haan & Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6
- 81 Koide et al. (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
- 82 Nygren et al. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469
- 10 83 Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag
New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
- 84 Mendez, M. et al. (1997) *Nature Genet*, **15**(2): 146–156
- 85 Knappik et al. *J. Mol. Biol.* (2000) 296, 57-86
- 86 Krebs et al. *Journal of Immunological Methods* 254 2001 67–84
- 15 87 Ward, E.S. et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)
- 88 McCafferty et al (1990) *Nature*, 348, 552-554
- 89 Holt et al (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
- 90 Bird et al, *Science*, 242, 423-426, 1988;
- 91 Huston et al, *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988
- 20 92 Holliger, P. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993
- 93 Reiter, Y. et al, *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996
- 94 Hu, S. et al, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996.
- 95 Holliger, P. and Winter G. *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-449
1993
- 25 96 Ridgeway, J. B. B. et al, *Protein Eng.*, 9, 616-621, 1996
- 97 *Ann N Y Acad Sci.* 1971 Dec 31;190:382-93.
- 98 Kabat, E.A. et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4th
Edition. US Department of Health and Human Services. 1987
- 99 Kabat, E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological*

Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington.

100 Persic et al 1997 *Gene* 187; 9-18

101 Hanes J et al (2000) *Methods in Enzymology*, Vol 328:24.

5 102 Vaughan TJ et al (1996) *Nature Biotechnology* Vol 14:309

103 Sloodstra-JW; Puijk-WC; Ligtoet-GJ; Langeveld-JP; Meloen-RH (1996). *Mol-Divers.* 1: 87-96

104 W001/66754 Cambridge Antibody Technology Limited; Vaughan; Wilton; Smith; Main

10 105 P.K. Smith, *et al.*, *Anal. Biochem.* **150** (1985), pp. 76–85

106 S. Mizushima and S. Nagata *Nucleic Acids Research*, Vol 18; No 17 1990 pp 5322

107 Clin Haematol. 1979 Jun;8(2):263-85. Metcalf D.

108 Nishijima, I., T. Nakahata, et al. (1997). *Blood* 90(3): 1031-8.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Fabri, Louis Jerry

<120> ELEMENTO DE LIGAÇÃO PARA RECEPTOR DE GM-CSF

<130> HMK/CP6442578

<140> PCT/GB2007/001108

<141> 2007-03-27

<150> US 60/786569

<151> 2006-03-27

<160> 258

<170> Cambridge Antibody Technology patent software version 1.0

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 1

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcatgtaaag ttcccgata caccctcact gaactgtcca tccactgggt gcgacaggct	120
cccgaaaaag gacttgagtg gatgggagga ttgtatcctg aagagaatga aatagtctac	180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacggcctac	240
atggaactga gcagcctgag atccgaggac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg	300
tctttcagtg gcategccta tcgcccctgg ggccaaggga caatgggtcac cgtctcctca	360

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 2

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

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 3

Glu	Leu	Ser	Ile	His
				5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

```

<223>  Abl
<400>  4
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
                    5                      10                      15

Gly
<210>  5
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Abl
<400>  5
Val Gly Ser Phe Ser Gly Ile Ala Tyr Arg Pro
                    5                      10

<210>  6
<211>  339
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Abl
<400>  6
cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagctc gatcagcacg 300
attttcggcg gagggaccaa gctcaccgtc ctaggtgctg 339

<210>  7
<211>  113
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Abl
<400>  7
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
                    5                      10                      15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
                    20                      25                      30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
                    35                      40                      45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
                    50                      55                      60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
                    65                      70                      75                      80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
                    85                      90                      95
Ser Ile Ser Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
                    100                      105                      110

Ala
<210>  8
<211>  14
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Abl
<400>  8
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
                    5                      10

<210>  9
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

<223> Ab1
 <400> 9
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab1
 <400> 10
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Ser Ile Ser Thr Ile
 5 10

<210> 11
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab2
 <400> 11
 caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
 tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagt gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
 tctttcagt gccccgccct gcgcccctgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt 360

<210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab2
 <400> 12
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab2
 <400> 13
 Glu Leu Ser Ile His
 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223>	Ab2
<400>	14
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln	
	5 10 15
Gly	
<210>	15
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab2
<400>	15
Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro	
	5 10
<210>	16
<211>	339
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab2
<400>	16
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctccaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg	300
gttttcggcg gagggacca ggtcacccgc ctaggtgcc	339
<210>	17
<211>	113
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab2
<400>	17
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
	5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro	
	20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
	35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
	50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
	65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser	
	85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105 110
Ala	
<210>	18
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab2
<400>	18
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser	
	5 10
<210>	19
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	

<223> Ab2
 <400> 19
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab2
 <400> 20
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 5 10

<210> 21
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab3
 <400> 21

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgttc	aatagtgggg	300
tctttcagtg	gctgggcctt	tgactactgg	ggcaaaggga	caatggtcac	cgtctcgagt	360

<210> 22
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab3
 <400> 22

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

<210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab3
 <400> 23
 Glu Leu Ser Ile His
 5

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223>	Ab3
<400>	24
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln	
	5 10 15
Gly	
<210>	25
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab3
<400>	25
Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr	
	5 10
<210>	26
<211>	339
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab3
<400>	26
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tctctgtactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctccaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg	300
gttttcgggg gagggacca ggtcacccgtc ctaggtgcg	339
<210>	27
<211>	113
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab3
<400>	27
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
	5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro	
	20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
	35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
	50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
	65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser	
	85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105 110
Ala	
<210>	28
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab3
<400>	28
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser	
	5 10
<210>	29
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	

```
<223>   Ab3
<400>   29
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
                    5
```

```
<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
```

```
<223>    Ab3
<400>    30
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
                5                10
```

```
<210> 31
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<220>							
<223>	Ab4						
<400>	31						
caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggggcctc	agtgaaggtc		60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact		120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac		180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac		240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgtgc	aatagtgggg		300
tctttcagtc	ccccqacctt	cgggtactgg	ggcaaaggga	caatgggtcac	cgtctcgagt		360

<210>	32
<211>	120
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

```

<220>
<223>      Ab4
<400>      32
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
          5              10              15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
          20              25              30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
          35              40              45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
          50              55              60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85              90              95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Lys
          100              105              110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115              120

```

```
<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<220>
<223>    Ab4
<400>    33
Glu Leu Ser Ile His
                    5

```

```
<210>    34
<211>    17
<212>    PRT
<213>    Homo sapiens
<220>
```

```

<223>  Ab4
<400>  34
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
      5                               10                      15

Gly
<210>  35
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab4
<400>  35
Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr
      5                               10

<210>  36
<211>  339
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab4
<400>  36
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgctg 339

<210>  37
<211>  113
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab4
<400>  37
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5                               10                      15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20                          25                      30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35                          40                      45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                          55                      60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                          70                      75                      80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85                          90                      95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
      100                        105                      110

Ala
<210>  38
<211>  14
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab4
<400>  38
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
      5                               10

<210>  39
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab4
<400>  39
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  40
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab4
<400>  40
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
      5                      10

<210>  41
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab5
<400>  41
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcacccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
tctttcagtg gctaccctta ccgcccgtgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210>  42
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab5
<400>  42
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                      10                      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                      25                      30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                      40                      45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                      55                      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                      70                      75                      80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro Trp Gly Gln
      100                     105                     110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                      120

<210>  43
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab5
<400>  43
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  44
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223> Ab5
<400> 44
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
      5                      10                      15

Gly
<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab5
<400> 45
Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro
      5                      10

<210> 46
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab5
<400> 46
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggcc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taticataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 47
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab5
<400> 47
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5                      10                      15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20                      25                      30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35                      40                      45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                      55                      60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                      70                      75                      80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85                      90                      95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
      100                      105                      110

Ala
<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab5
<400> 48
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
      5                      10

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab5
<400>  49
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5
<210>  50
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab5
<400>  50
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
      5                      10
<210>  51
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab6
<400>  51
caggtccagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaag tttccggata caccctcact gaactgtcca tccactgggt gcgacaggct 120
cccggaaaag gacttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacggcctac 240
atggaactga gcagcctgag atccgaggac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
tctttcagtc ccttgacctt gggcctctgg ggccaaggga caatgggtcac cgtctcctca 360
<210>  52
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab6
<400>  52
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                      10                      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
      20                      25                      30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35                      40                      45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                      55                      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
      65                      70                      75                      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu Trp Gly Gln
      100                     105                     110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                     120
<210>  53
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab6
<400>  53
Glu Leu Ser Ile His
      5
<210>  54
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab6
<400>  54
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
      5                               10                      15

Gly
<210>  55
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab6
<400>  55
Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu
      5                               10

<210>  56
<211>  339
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab6
<400>  56
cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgaccgttg aggccggcct gagtgggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggtgctg 339

<210>  57
<211>  113
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab6
<400>  57
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5                               10                      15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20                          25                      30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35                          40                      45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                          55                      60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                          70                      75                      80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Ala Gly
      85                          90                      95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100                       105                      110

Ala
<210>  58
<211>  14
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab6
<400>  58
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
      5                               10

<210>  59
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

<223> Ab6
 <400> 59
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab6
 <400> 60
 Ala Thr Val Glu Ala Gly Leu Ser Gly Ser Val
 5 10

<210> 61
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab7
 <400> 61
 caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gccccgtgta cggcctctgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt 360

<210> 62
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab7
 <400> 62
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab7
 <400> 63
 Glu Leu Ser Ile His
 5

<210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223>	Ab7
<400>	64
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln	
	5 10 15
Gly	
<210>	65
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab7
<400>	65
Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu	
	5 10
<210>	66
<211>	339
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab7
<400>	66
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggcc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggtc caacatcggt gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctgaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg	300
gttttcggcg gagggacca ggtcacccgtc ctaggtgcg	339
<210>	67
<211>	113
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab7
<400>	67
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
	5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro	
	20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
	35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
	50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
65 70 75 80	
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser	
	85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105 110
Ala	
<210>	68
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab7
<400>	68
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser	
	5 10
<210>	69
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	

```

<223>  Ab7
<400>  69
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  70
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab7
<400>  70
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
      5                      10

<210>  71
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab8
<400>  71
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
tcatgtaaaa ttcccgga cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
tctttcagtc ccccggccta ccgcccctgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210>  72
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab8
<400>  72
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                      10                      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                      25                      30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                      40                      45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                      55                      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                      70                      75                      80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Trp Gly Lys
      100                      105                      110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                      120

<210>  73
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab8
<400>  73
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  74
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab8
<400>  74
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
      5                                10                        15
Gly
<210>  75
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab8
<400>  75
Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro
      5                                10
<210>  76
<211>  339
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab8
<400>  76
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctagggtgcg 339
<210>  77
<211>  113
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab8
<400>  77
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5                                10                        15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20                        25                        30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35                                40                        45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                        55                        60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                        70                        75                        80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85                        90                        95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
      100                        105                        110
Ala
<210>  78
<211>  14
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab8
<400>  78
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
      5                                10
<210>  79
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab8
<400>  79
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  80
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab8
<400>  80
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
      5                               10

<210>  81
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab9
<400>  81
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcatgtaaaa ttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact      120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac      180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac      240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccggtt attattgtgc aatagtgggg      300
tctttcagtc cggtcacgta cggcctctgg ggccaaggga caatgggtcac cgtctcgagt      360

<210>  82
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab9
<400>  82
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                               10                               15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                               25                               30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                               40                               45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                               55                               60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                               70                               75                               80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                               90                               95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu Trp Gly Gln
      100                              105                              110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                              120

<210>  83
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab9
<400>  83
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  84
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab9
<400>  84
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
                    5                               10                   15

Gly
<210>  85
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab9
<400>  85
Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu
                    5                               10

<210>  86
<211>  339
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab9
<400>  86
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210>  87
<211>  113
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab9
<400>  87
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
                    5                               10                   15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
                    20                               25                   30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
                    35                               40                   45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
                    50                               55                   60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
                    65                               70                   75                   80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
                    85                               90                   95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
                    100                               105                   110

Ala
<210>  88
<211>  14
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab9
<400>  88
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
                    5                               10

<210>  89
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab9
<400>  89
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  90
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab9
<400>  90
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
      5                      10

<210>  91
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab10
<400>  91
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
tctttcagtg gcctcgcgta caggccctgg ggcaaaggga caatggtcac catctcgagt 360

<210>  92
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab10
<400>  92
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                      10                      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                      25                      30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                      40                      45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                      55                      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                      70                      75                      80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro Trp Gly Lys
      100                     105                     110
Gly Thr Met Val Thr Ile Ser Ser
      115                      120

<210>  93
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab10
<400>  93
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  94
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

<223>	Ab10
<400>	94
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln	
	5 10 15
Gly	
<210>	95
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab10
<400>	95
Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro	
	5 10
<210>	96
<211>	339
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab10
<400>	96
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg	300
gttttcggcg gagggacca ggtcacgcgc ctaggtgcg	339
<210>	97
<211>	113
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab10
<400>	97
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
	5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro	
	20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
	35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
	50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
	65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser	
	85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105 110
Ala	
<210>	98
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab10
<400>	98
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser	
	5 10
<210>	99
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	

```

<223>  Ab10
<400>  99
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  100
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab10
<400>  100
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
      5                      10

<210>  101
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab11
<400>  101
caggtgcagc tgggtgcaatc tggcgctgag gtgaagaagc ctgaggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa ttccgggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgattcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccggtt attattgtgc aatagtgggg 300
tctttcagtc cgatcacgta cggcctctgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt 360

<210>  102
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab11
<400>  102
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Glu Ala
      5                      10                      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Pro Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                      25                      30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                      40                      45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                      55                      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                      70                      75                      80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu Trp Gly Lys
      100                      105                      110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                      120

<210>  103
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab11
<400>  103
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  104
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

<223>	Ab11
<400>	104
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln	
	5 10 15
Gly	
<210>	105
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab11
<400>	105
Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu	
	5 10
<210>	106
<211>	339
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab11
<400>	106
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg	300
gttttcggcg gagggacca ggtcacctgc ctagggtgcg	339
<210>	107
<211>	113
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab11
<400>	107
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Pro Gly Gln	
	5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro	
	20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
	35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
	50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
	65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser	
	85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105 110
Ala	
<210>	108
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab11
<400>	108
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser	
	5 10
<210>	109
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	

```

<223>  Ab11
<400>  109
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  110
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab11
<400>  110
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
      5                      10

<210>  111
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab12
<400>  111
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
tctttcagtg gctgggcctt tgactactgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210>  112
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab12
<400>  112
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                      10                      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                      25                      30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                      40                      45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                      55                      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                      70                      75                      80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
      100                     105                     110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                      120

<210>  113
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab12
<400>  113
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  114
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab12
<400>  114
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
      5                      10                      15
Gly
<210>  115
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab12
<400>  115
Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
      5                      10
<210>  116
<211>  339
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab12
<400>  116
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagcc gaccgagatc 300
cgcttcgggg gagggaccaa gtcaccgtc ctaggtgctg 339
<210>  117
<211>  113
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab12
<400>  117
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5                      10                      15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20                      25                      30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35                      40                      45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                      55                      60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                      70                      75                      80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
      85                      90                      95
Pro Thr Glu Ile Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100                      105                      110
Ala
<210>  118
<211>  14
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab12
<400>  118
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
      5                      10
<210>  119
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab12
<400>  119
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  120
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab12
<400>  120
Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg
      5                               10

<210>  121
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab13
<400>  121
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa ttccgggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcacccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
tctttcagtg gctgggcctt tgactactgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210>  122
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab13
<400>  122
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                               10                               15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                               25                               30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                               40                               45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                               55                               60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                               70                               75                               80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                               90                               95
Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
      100                              105                              110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                              120

<210>  123
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab13
<400>  123
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  124
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

<223>	Ab13
<400>	124
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln	
	5 10 15
Gly	
<210>	125
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab13
<400>	125
Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr	
	5 10
<210>	126
<211>	339
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab13
<400>	126
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tctgttactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctccaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcaggac gggcatcatc	300
gtcttcgggg gagggacca ggtcacctgc ctaggtgcg	339
<210>	127
<211>	113
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab13
<400>	127
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
	5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro	
	20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
	35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
	50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
	65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Arg	
	85 90 95
Thr Gly Ile Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105 110
Ala	
<210>	128
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab13
<400>	128
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser	
	5 10
<210>	129
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	

```

<223>  Ab13
<400>  129
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  130
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab13
<400>  130
Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Thr Gly Ile Ile Val
      5                               10

<210>  131
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab14
<400>  131
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa ttcccgga cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatggggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcacccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatattgggg 300
agcgtgaccg cctgggcctt tgactactgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210>  132
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab14
<400>  132
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                               10                               15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                               25                               30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                               40                               45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                               55                               60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                               70                               75                               80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                               90                               95
Ser Ile Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
      100                              105                              110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                              120

<210>  133
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab14
<400>  133
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  134
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

<223>	Ab14
<400>	134
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln	
	5 10 15
Gly	
<210>	135
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab14
<400>	135
Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr	
	5 10
<210>	136
<211>	339
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab14
<400>	136
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tctgttactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctccaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggtga ttattactgc cagtcctatg acagcgagga caggatgacg	300
gagttcgggg gagggacca ggtcacgcgc ctaggtgcg	339
<210>	137
<211>	113
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab14
<400>	137
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
	5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro	
	20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
	35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
	50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
	65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu	
	85 90 95
Asp Arg Met Thr Glu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105 110
Ala	
<210>	138
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab14
<400>	138
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser	
	5 10
<210>	139
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	

```

<223>  Ab14
<400>  139
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5
<210>  140
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab14
<400>  140
Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Asp Arg Met Thr Glu
      5                               10
<210>  141
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab15
<400>  141
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagccggg 300
agcatccccg gctgggcctt tgactactgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt 360
<210>  142
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab15
<400>  142
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                               10                               15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                               25                               30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                               40                               45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                               55                               60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                               70                               75                               80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                               90                               95
Ser Ile Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
      100                              105                              110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                              120
<210>  143
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab15
<400>  143
Glu Leu Ser Ile His
      5
<210>  144
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

[illegible]

```

<223>  Ab15
<400>  149
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  150
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab15
<400>  150
Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Leu Ile Ser Ala Ala
      5                               10

<210>  151
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab16
<400>  151
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaaa gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
tctttcagtc cgttgaccat gggcctctgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210>  152
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab16
<400>  152
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                               10                               15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                               25                               30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                               40                               45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                               55                               60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                               70                               75                               80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                               90                               95
Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu Trp Gly Lys
      100                              105                              110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                              120

<210>  153
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab16
<400>  153
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  154
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

<223>	Ab16
<400>	154
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln	
	5 10 15
Gly	
<210>	155
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab16
<400>	155
Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu	
	5 10
<210>	156
<211>	339
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab16
<400>	156
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctccaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgacctccg acgagatcct gagtgggtcg	300
gttttcgggg gagggacca ggtcacccgtc ctaggtgcg	339
<210>	157
<211>	113
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab16
<400>	157
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
	5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro	
	20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
	35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
	50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
	65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Ser Asp Glu Ile	
	85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	
	100 105 110
Ala	
<210>	158
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab16
<400>	158
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser	
	5 10
<210>	159
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	

```

<223>  Ab16
<400>  159
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  160
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab16
<400>  160
Ala Thr Ser Asp Glu Ile Leu Ser Gly Ser Val
      5                               10

<210>  161
<211>  360
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab17
<400>  161
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa ttcccgaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
tcttttcagtc ccctgacgat ggggttgtgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt 360

<210>  162
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab17
<400>  162
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5                               10                               15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                               25                               30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                               40                               45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                               55                               60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                               70                               75                               80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                               90                               95
Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu Trp Gly Lys
      100                              105                              110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                              120

<210>  163
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<223>  Ab17
<400>  163
Glu Leu Ser Ile His
      5

<210>  164
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab17
<400>  164
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
                    5                                10                    15

Gly
<210>  165
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab17
<400>  165
Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu
                    5                                10

<210>  166
<211>  339
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab17
<400>  166
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggetga ttattactgc gcgaccgtcg aggacggcct gagtgggttcg 300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctagggtgcg 339

<210>  167
<211>  113
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab17
<400>  167
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
                    5                                10                    15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
                    20                    25                    30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
                    35                    40                    45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
                    50                    55                    60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65                    70                    75                    80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Asp Gly
                    85                    90                    95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
                    100                    105                    110

Ala
<210>  168
<211>  14
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab17
<400>  168
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
                    5                                10

<210>  169
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

<223> Ab17
 <400> 169
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 <210> 170
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab17
 <400> 170
 Ala Thr Val Glu Asp Gly Leu Ser Gly Ser Val
 5 10
 <210> 171
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab18
 <400> 171
 caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgttca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aacagtgggg 300
 tctttcagtg ggcccgcctt tcacctctgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt 360
 <210> 172
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab18
 <400> 172
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Phe Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Thr Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 173
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab18
 <400> 173
 Glu Leu Phe Ile His
 5
 <210> 174
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> Ab18

<400> 174

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

Gly

<210> 175

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab18

<400> 175

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu
5 10

<210> 176

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$

<223> Ab18

<400> 176

caggctgtgc	tgactcagcc	gtcctcagtg	tctggggccc	cagggcagag	ggtcaccatc	60
tctgtactg	ggagcggctc	caacatcggg	gcaccttatg	atgtaagctg	gtaccagcag	120
cttcaggaa	cagcccccac	actcctcatc	tatcataaca	acaagcggcc	ctcaggggtc	180
cctgaccgat	tctctgcctc	caagtctggc	acctcagcct	ccctggccat	cactgggctc	240
caggctgacg	atgaggctga	ttattactgc	cagtcctatg	acagccagtg	gaaccagccc	300
ctcttcgggg	gagggaccac	ggtcaccgtc	ctaggtgcg			339

<210> 177

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$

<223> Ab18

<400> 177

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30

Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln
85 90 95

Trp Asn Gln Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Ala

<210> 178

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab18

<400> 178

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210> 179

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab18

<400> 179

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 180

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab18

<400> 180

Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Trp Asn Gln Pro Leu

5

10

<210> 181

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 181

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgtgc	aatagtgggg	300
tctgtcagtc	gcatcacgta	cggcttctgg	ggcaaaggga	caatgggtcac	cgtctcgagt	360

<210> 182

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 182

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

<210> 183

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 183

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 184

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 184

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

Gly

<210> 185

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 185

Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe
 5 10

<210> 186

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 186

caggctgtgc	tgactcagcc	gtcctcagtg	tctggggccc	cagggcagag	ggtcaccatc	60
tcctgtactg	ggagcggctc	caacatcggg	gcaccttatg	atgtaagctg	gtaccagcag	120
cttccaggaa	cagcccccaa	actcctcadc	tatcataaca	acaagcggcc	ctcaggggtc	180
cctgaccgat	tctctgcctc	caagtctggc	acctcagcct	ccctggccat	cactggggtc	240
caggctgacg	atgaggctga	ttattactgc	cagtcctatg	acagccggaa	cccccacgtc	300
atcttcgggg	gagggaccaa	gtcacccgtc	ctaagtgcg			339

<210> 187

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 187

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

Ala

<210> 188

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 188

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 189

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223>	Ab19
<400>	189
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser	
	5
<210>	190
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab19
<400>	190
Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Asn Pro His Val Ile	
	5 10
<210>	191
<211>	360
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab20
<400>	191
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa ttcccggaaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact	120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac	180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac	240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg	300
tcttttcagtc ccctgacgct gggcctctgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt	360
<210>	192
<211>	120
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab20
<400>	192
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
	5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu	
	20 25 30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met	
	35 40 45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe	
	50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95
Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu Trp Gly Lys	
	100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
	115 120
<210>	193
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	
<223>	Ab20
<400>	193
Glu Leu Ser Ile His	
	5
<210>	194
<211>	17
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<220>	

```

<223>  Ab20
<400>  194
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
      5                                10                                15

Gly
<210>  195
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab20
<400>  195
Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu
      5                                10

<210>  196
<211>  339
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab20
<400>  196
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc gcgaccgtgg acgaggccct gagggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaagtgcg 339

<210>  197
<211>  113
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab20
<400>  197
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5                                10                                15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20                                25                                30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35                                40                                45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                                55                                60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                                70                                75                                80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Asp Glu Ala
      85                                90                                95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser
      100                                105                                110

Ala
<210>  198
<211>  14
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab20
<400>  198
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
      5                                10

<210>  199
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

```

```

<223>  Ab20
<400>  199
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

<210>  200
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab20
<400>  200
Ala Thr Val Asp Glu Ala Leu Ser Gly Ser Val
      5                               10

<210>  201
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<400>  201
Tyr Leu Asp Phe Gln
      5

<210>  202
<211>  385
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<400>  202
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1      5      10      15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro
      20      25      30
Ala Ser Ser Leu Asn Val Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser
      35      40      45
Trp Asp Cys Gln Glu Asn Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp
      50      55      60
Lys Lys Asn Arg Val Val Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser
65      70      75      80
Cys Thr Phe Arg Glu Ile Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val
      85      90      95
His Val Asn Thr Ser Gln Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro
      100     105     110
Asn Ser Gly Arg Glu Gly Thr Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile
      115     120     125
Tyr Asn Ala Asp Leu Met Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala
      130     135     140
Pro Arg Asp Val Gln Tyr Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg
145     150     155     160
Arg Glu Ile Arg Cys Pro Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val
      165     170     175
Gly Cys His Leu Asp Asn Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe
      180     185     190
Leu Val Asn Gly Thr Ser Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser
      195     200     205
Leu Leu Asp Thr Lys Lys Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val
      210     215     220
Thr Val Arg Cys Asn Thr Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro
225     230     235     240
Arg Thr Tyr Gln Lys Leu Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp
      245     250     255
Val His Arg Lys Asn Thr Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn
      260     265     270
Val Ser Gly Asp Leu Glu Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro
      275     280     285
Arg Ala Lys His Ser Val Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu
      290     295     300

```

```

Asn Trp Ser Ser Trp Ser Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly
305          310          315          320
Asn Leu Gly Ser Val Tyr Ile Tyr Val Leu Leu Ile Val Gly Thr Leu
          325          330          335
Val Cys Gly Ile Val Leu Gly Phe Leu Phe Lys Arg Phe Leu Arg Ile
          340          345          350
Gln Arg Leu Phe Pro Pro Val Pro Gln Ile Lys Asp Lys Leu Asn Asp
          355          360          365
Asn His Glu Val Glu Asp Glu Ile Ile Trp Glu Glu Phe Thr Pro Glu
          370          375          380
Glu
385
<210> 203
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<220>
<223> Sequência humana com etiqueta FLAG
<400> 203
Ala Ser Ile Ser Ala Arg Gln Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr
1          5          10          15
Arg Gln Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu
          20          25          30
Asn Val Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln
          35          40          45
Glu Asn Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg
          50          55          60
Val Val Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser Cys Thr Phe Arg
65          70          75          80
Glu Ile Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val His Val Asn Thr
          85          90          95
Ser Gln Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro Asn Ser Gly Arg
          100          105          110
Glu Gly Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile Tyr Asn Ala Asp
          115          120          125
Leu Met Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala Pro Arg Asp Val
          130          135          140
Gln Tyr Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg Arg Glu Ile Arg
          145          150          155          160
Cys Pro Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val Gly Cys His Leu
          165          170          175
Asp Asn Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe Leu Val Asn Gly
          180          185          190
Thr Ser Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser Leu Leu Asp Thr
          195          200          205
Lys Lys Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val Thr Val Arg Cys
          210          215          220
Asn Thr Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro Arg Thr Tyr Gln
          225          230          235          240
Lys Leu Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp Val His Arg Lys
          245          250          255
Asn Thr Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn Val Ser Gly Asp
          260          265          270
Leu Glu Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro Arg Ala Lys His
          275          280          285
Ser Val Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu Asn Trp Ser Ser
          290          295          300
Trp Ser Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly
          305          310          315
<210> 204
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Peptideo FLAG sintético
<400> 204
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5
<210> 205
<211> 298
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 205
Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu Asn Val
1 5 10 15
Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln Glu Asn
20 25 30
Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg Val Val
35 40 45
Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser Cys Thr Phe Arg Glu Ile
50 55 60
Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val His Val Asn Thr Ser Gln
65 70 75 80
Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro Asn Ser Gly Arg Glu Gly
85 90 95
Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile Tyr Asn Ala Asp Leu Met
100 105 110
Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala Pro Arg Asp Val Gln Tyr
115 120 125
Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg Arg Glu Ile Arg Cys Pro
130 135 140
Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val Gly Cys His Leu Asp Asn
145 150 155 160
Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe Leu Val Asn Gly Thr Ser
165 170 175
Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser Leu Leu Asp Thr Lys Lys
180 185 190
Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val Thr Val Arg Cys Asn Thr
195 200 205
Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro Arg Thr Tyr Gln Lys Leu
210 215 220
Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp Val His Arg Lys Asn Thr
225 230 235 240
Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn Val Ser Gly Asp Leu Glu
245 250 255
Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro Arg Ala Lys His Ser Val
260 265 270
Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu Asn Trp Ser Ser Trp Ser
275 280 285
Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly
290 295
<210> 206
<211> 378
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 206
Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu Asn Val
1 5 10 15
Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln Glu Asn
20 25 30
Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg Val Val
35 40 45
Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser Cys Thr Phe Arg Glu Ile
50 55 60
Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val His Val Asn Thr Ser Gln
65 70 75 80

```

Arg	Gly	Phe	Gln	Gln	Lys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Asn	Ser	Gly	Arg	Glu	Gly		
				85					90					95			
Thr	Ala	Ala	Gln	Asn	Phe	Ser	Cys	Phe	Ile	Tyr	Asn	Ala	Asp	Leu	Met		
			100					105					110				
Asn	Cys	Thr	Trp	Ala	Arg	Gly	Pro	Thr	Ala	Pro	Arg	Asp	Val	Gln	Tyr		
		115					120					125					
Phe	Leu	Tyr	Ile	Arg	Asn	Ser	Lys	Arg	Arg	Arg	Glu	Ile	Arg	Cys	Pro		
	130					135					140						
Tyr	Tyr	Ile	Gln	Asp	Ser	Gly	Thr	His	Val	Gly	Cys	His	Leu	Asp	Asn		
145					150					155					160		
Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Arg	Asn	Tyr	Phe	Leu	Val	Asn	Gly	Thr	Ser		
				165					170					175			
Arg	Glu	Ile	Gly	Ile	Gln	Phe	Phe	Asp	Ser	Leu	Leu	Asp	Thr	Lys	Lys		
			180					185					190				
Ile	Glu	Arg	Phe	Asn	Pro	Pro	Ser	Asn	Val	Thr	Val	Arg	Cys	Asn	Thr		
		195					200					205					
Thr	His	Cys	Leu	Val	Arg	Trp	Lys	Gln	Pro	Arg	Thr	Tyr	Gln	Lys	Leu		
	210					215					220						
Ser	Tyr	Leu	Asp	Phe	Gln	Tyr	Gln	Leu	Asp	Val	His	Arg	Lys	Asn	Thr		
225					230					235					240		
Gln	Pro	Gly	Thr	Glu	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	Val	Ser	Gly	Asp	Leu	Glu		
				245					250					255			
Asn	Arg	Tyr	Asn	Phe	Pro	Ser	Ser	Glu	Pro	Arg	Ala	Lys	His	Ser	Val		
			260					265					270				
Lys	Ile	Arg	Ala	Ala	Asp	Val	Arg	Ile	Leu	Asn	Trp	Ser	Ser	Trp	Ser		
		275					280					285					
Glu	Ala	Ile	Glu	Phe	Gly	Ser	Asp	Asp	Gly	Asn	Leu	Gly	Ser	Val	Tyr		
	290					295					300						
Ile	Tyr	Val	Leu	Leu	Ile	Val	Gly	Thr	Leu	Val	Cys	Gly	Ile	Val	Leu		
305					310					315					320		
Gly	Phe	Leu	Phe	Lys	Arg	Phe	Leu	Arg	Ile	Gln	Arg	Leu	Phe	Pro	Pro		
				325					330					335			
Val	Pro	Gln	Ile	Lys	Asp	Lys	Leu	Asn	Asp	Asn	His	Glu	Val	Glu	Asp		
			340					345					350				
Glu	Ile	Ile	Trp	Glu	Glu	Phe	Thr	Pro	Glu	Glu	Gly	Lys	Gly	Tyr	Arg		
		355					360					365					
Glu	Glu	Val	Leu	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr								
	370					375											

<210> 207
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab1
 <400> 207

cagtctgtgc	tgactcagcc	gccctcagtg	tctggggccc	cagggcagag	ggtcaccatc	60
tcctgtactg	ggagcggctc	caacatcggg	gcaccttatg	atgtaagctg	gtaccagcag	120
cttccaggaa	cagcccccaa	actcctcacc	tatcataaca	acaagcggcc	ctcagggggtc	180
cctgaccgat	tctctggctc	caagtctggc	acctcagcct	ccctggccat	cactggggtc	240
caggctgagg	atgaggctga	ttattactgc	cagtcctatg	acagcagctc	gatcagcacg	300
attttcggcg	gagggaccaa	gtcaccgctc	cta			333

<210> 208
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab1
 <400> 208

Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln		
			5						10					15			
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Pro		
			20					25					30				
Tyr	Asp	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu		

```

      35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65              70              75              80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85              90              95
Ser Ile Ser Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100              105              110
<210> 209
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab2
<400> 209
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333
<210> 210
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab2
<400> 210
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65              70              75              80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85              90              95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
      100              105              110
<210> 211
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab3
<400> 211
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333
<210> 212
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab3
<400> 212

```

Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	
				5					10					15		
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Pro	
			20					25					30			
Tyr	Asp	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	
		35					40					45				
Leu	Ile	Tyr	His	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	
	50					55					60					
Ser	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu	
65					70					75					80	
Gln	Ala	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser	
				85					90					95		
Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu		
			100					105					110			
<210>		213														
<211>		333														
<212>		DNA														
<213>		Homo sapiens														
<220>																
<223>		Ab4														
<400>		213														
caggctgtgc	tgactcagcc	gtcctcagtg	tctggggccc	cagggcagag	ggtcaccatc											60
tcctgtactg	ggagcggctc	caacatcggg	gcaccttatg	atgtaagctg	gtaccagcag											120
cttccaggaa	cagcccccaa	actcctcatc	tatcataaca	acaagcggcc	ctcaggggtc											180
cctgaccgat	tctctgcctc	caagtctggc	acctcagcct	ccctggccat	cactggggtc											240
caggctgacg	atgaggctga	ttattactgc	cagtcctatg	acagcagcct	gagtggttcg											300
gttttcggcg	gagggacca	ggtcaccgtc	cta													333
<210>		214														
<211>		111														
<212>		PRT														
<213>		Homo sapiens														
<220>																
<223>		Ab4														
<400>		214														
Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	
			5						10					15		
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Pro	
		20						25					30			
Tyr	Asp	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	
		35					40					45				
Leu	Ile	Tyr	His	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	
	50					55					60					
Ser	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu	
65					70					75					80	
Gln	Ala	Asp														

```

<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab5
<400>  216
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65              70              75              80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85              90              95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
      100             105             110

<210>  217
<211>  333
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab6
<400>  217
cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgaccgttg aggccggcct gagtgggttc 300
gttttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210>  218
<211>  111
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab6
<400>  218
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65              70              75              80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Ala Gly
      85              90              95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100             105             110

<210>  219
<211>  333
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens
<220>
<223>  Ab7
<400>  219
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

```

```

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgctc cta 333

```

<210> 220

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 220

```

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
                    5                      10                      15

```

```

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
                20                      25                      30

```

```

Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
                35                      40                      45

```

```

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
                50                      55                      60

```

```

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
        65                70                75                80

```

```

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
                85                90                95

```

```

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
        100                105                110

```

<210> 221

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 221

```

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

```

```

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

```

```

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

```

```

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

```

```

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg 300

```

```

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgctc cta 333

```

<210> 222

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 222

```

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
                    5                      10                      15

```

```

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
                20                      25                      30

```

```

Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
                35                      40                      45

```

```

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
                50                      55                      60

```

```

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
        65                70                75                80

```

```

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
                85                90                95

```

```

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
        100                105                110

```

<210> 223

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

```

<223>   Ab9
<400>   223
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc   60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag   120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc   180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc   240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg   300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta                                   333
<210>   224
<211>   111
<212>   PRT
<213>   Homo sapiens
<220>
<223>   Ab9
<400>   224
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
          5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
          20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
          35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
          50              55              60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
          65              70              75              80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
          85              90              95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
          100             105             110
<210>   225
<211>   333
<212>   DNA
<213>   Homo sapiens
<220>
<223>   Ab10
<400>   225
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc   60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag   120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc   180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc   240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg   300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta                                   333
<210>   226
<211>   111
<212>   PRT
<213>   Homo sapiens
<220>
<223>   Ab10
<400>   226
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
          5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
          20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
          35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
          50              55              60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
          65              70              75              80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
          85              90              95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
          100             105             110

```

```

<210> 227
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab11
<400> 227
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333
<210> 228
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab11
<400> 228
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Pro Gly Gln
      5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65              70              75              80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85              90              95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
      100              105              110
<210> 229
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab12
<400> 229
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagcc gaccgagatc 300
cgcttcgggg gagggaccaa gctcaccgtc cta 333
<210> 230
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab12
<400> 230
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

```

[illegible]

```

Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
    35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
    50              55              60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
    65              70              75              80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
    85              90              95
Asp Arg Met Thr Glu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
    100              105              110
<210> 235
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab15
<400> 235
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccagtt gattagcgcc 300
gccttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333
<210> 236
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab15
<400> 236
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
    5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
    20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
    35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
    50              55              60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
    65              70              75              80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln
    85              90              95
Leu Ile Ser Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
    100              105              110
<210> 237
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab16
<400> 237
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc ggcacctccg acgagatcct gagtgggttc 300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333
<210> 238
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab16

```

<400> 238

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

<210> 239

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 239

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc ggcaccgtcg aggacggcct gagggttcg 300
 gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 240

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 240

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

<210> 241

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab18

<400> 241

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccagtg gaaccagccc 300
 ctcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 242

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab18
 <400> 242

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

<210> 243
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab19
 <400> 243

caggctgtgc	tgactcagcc	gtcctcagtg	tctggggccc	cagggcagag	ggtcaccatc	60
tcctgtactg	ggagcggctc	caacatcggg	gcaccttatg	atgtaagctg	gtaccagcag	120
cttccaggaa	cagcccccaa	actcctcatc	tatcataaca	acaagcggcc	ctcaggggtc	180
cctgaccgat	tctctgcctc	caagtctggc	acctcagcct	ccctggccat	cactgggctc	240
caggctgacg	atgaggctga	ttattactgc	cagtcctatg	acagccggaa	cccccacgtc	300
atcttcgggg	gagggaccaa	gtcaccgctc	cta			333

<210> 244
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab19
 <400> 244

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

<210> 245
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab20
 <400> 245

caggctgtgc	tgactcagcc	gtcctcagtg	tctggggccc	cagggcagag	ggtcaccatc	60
tcctgtactg	ggagcggctc	caacatcggg	gcaccttatg	atgtaagctg	gtaccagcag	120

```

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc gcgaccgtgg acgaggccct gagtgggtcg 300
gttttcggcg gagggacca ggtcaccgtc cta 333
<210> 246
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab20
<400> 246
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65              70              75              80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Asp Glu Ala
      85              90              95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
      100             105             110
<210> 247
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Linhagem não germinal de Ab 6
<400> 247
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccggtt attattgttc aatagtgggg 300
tctttcagtc cgctaacgtt gggcctctgg ggcaaaggga caatgggtcac cgtctcgagt 360
<210> 248
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Linhagem não germinal de Ab 6
<400> 248
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      5              10              15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20              25              30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35              40              45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50              55              60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu Trp Gly Lys
      100             105             110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115             120
<210> 249
<211> 333

```

```

<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Linhagem não germinal de Ab 6
<400> 249
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
caggctgacg atgaggtgga ttattactgc gcgacggtcg aggccggcct gagtgggttcg 300
gttttcgggg gagggaccaa gtcaccgtc cta 333
<210> 250
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Linhagem não germinal de Ab 6
<400> 250
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Ala Gly
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110
<210> 251
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6
<400> 251
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr
20 25 30
<210> 252
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6
<400> 252
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
5 10
<210> 253
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6
<400> 253
Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu
5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile
20 25 30

```

```

<210> 254
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6
<400> 254
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
                    5                      10

<210> 255
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6
<400> 255
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
                    5                      10                      15
Arg Val Thr Ile Ser Cys
                20

<210> 256
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6
<400> 256
Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
                    5                      10                      15

<210> 257
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6
<400> 257
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
                    5                      10                      15
Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
                20                      25                      30

<210> 258
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6

<400> 258
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
                    5                      10

```

REIVINDICAÇÕES

1. Elemento de ligação isolado para GM-CSFR α humano, caracterizado pelo fato de que o elemento de ligação inibe a ligação de GM-CSF a GM-CSFR α , e sendo que o elemento de ligação liga pelo menos um radical de Tyr-Leu-Asp-Phe-Gln nas posições de 226 a 230 de GM-CSFR α humano como mostrado na SEQ ID NO: 206.

2. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que se liga a domínio extracelular de GM-CSFR α com uma afinidade (KD) de 5 nM ou menos em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície.

3. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de anticorpo.

4. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio VH de anticorpo compreendendo um conjunto de regiões determinadoras de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3 e uma estrutura, sendo que o conjunto de regiões determinadoras de complementaridade compreende uma CDR1 com seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 173, uma CDR2 com seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 4, e uma CDR3 com seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 85; SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 175; SEQ ID NO: 185; e SEQ ID NO: 195;

ou compreende aquele conjunto de seqüências de CDR com uma ou duas substituições de aminoácidos.

5. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 3 ou

reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio VH de anticorpo compreendendo regiões determinadoras de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3 e uma estrutura, e sendo que o radical Kabat H97 em CDR3 VH é S.

5 6. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que CDR3 VH compreende adicionalmente um ou mais dos seguintes radicais:

V, N, A ou L no radical Kabat H95;

S, F, H, P, T ou W no radical Kabat H99;

10 A, T, P, S, V ou H no radical Kabat H100B.

7. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o radical Kabat H95 é V.

8. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 6 ou reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o radical Kabat H99 é S.

15 9. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 6 a 8, caracterizado pelo fato de que o radical Kabat H100B é A ou T.

10. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma de reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que CDR3 VH apresenta uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 185
25 e SEQ ID NO: 195.

11. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 10, caracterizado pelo fato de que o radical Kabat H34 na CDR1 VH é I.

12. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das

reivindicações de 5 a 11, caracterizado pelo fato de que CDR1 VH apresenta uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

13. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 12, caracterizado pelo fato de que CDR2 VH compreende E no radical Kabat H54 e/ou I no radical Kabat H57.

14. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 13, caracterizado pelo fato de que CDR2 VH apresenta uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

15. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 14, caracterizado pelo fato de que o radical Kabat H17 na estrutura do domínio VH é S.

16. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 15, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio VL de anticorpo compreendendo regiões determinadoras de complementaridade CDR1, CDR2 e CDR3 e a estrutura.

17. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que CDR3 VL compreende um ou mais dos seguintes radicais:

S, T ou M no radical Kabat L90;

20 D, E, Q, S, M ou T no radical Kabat L92;

S, P, I ou V no radical Kabat L96.

18. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o radical Kabat L90 é S.

19. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 17 ou reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o radical Kabat L92 é D ou E.

20. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 19, caracterizado pelo fato de que o radical Kabat L95A é S.

21. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das

reivindicações de 17 a 20, caracterizado pelo fato de que o radical Kabat L96 é S.

22. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que a CDR3 VL apresenta uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 190 e SEQ ID NO: 200.

23. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 22, caracterizado pelo fato de que CDR1 VL compreende um ou mais dos seguintes radicais:

S no radical Kabat 27A;
N no radical Kabat 27B;
I no radical Kabat 27C;
D no radical Kabat 32.

24. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 23, caracterizado pelo fato de que CDR1 VL apresenta uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

25. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 24, caracterizado pelo fato de que CDR2 VL compreende um ou mais dos seguintes radicais:

N no radical Kabat 51;
N no radical Kabat 52;
K no radical Kabat 53.

26. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 25, caracterizado pelo fato de que CDR2 VL apresenta uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 9.

27. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 26, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio VH de anticorpo em que o radical Kabat H94 é I.

5 28. Elemento de ligação isolado para GM-CSFR α humano, caracterizado pelo fato de que o elemento de ligação inibe a ligação de GM-CSF a GM-CSFR α , e sendo que o elemento de ligação liga-se ao domínio extracelular de GM-CSFR α humano com uma afinidade (KD) de 5 nM ou menos em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície.

10 29. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de anticorpo.

30. Elemento de ligação isolado para GM-CSFR α humano, caracterizado pelo fato de que o elemento de ligação inibe a ligação de GM-CSF a GM-CSFR α , e sendo que o elemento de ligação compreende uma molécula de anticorpo humana ou humanizada que compete pela ligação do
15 domínio extracelular de GM-CSFR α humano com uma molécula de anticorpo apresentando um domínio VH e um domínio VL com seqüências de aminoácidos selecionadas dentre as seguintes:

domínio VH da SEQ ID NO: 2 e domínio VL da SEQ ID NO:
7;

20 domínio VH da SEQ ID NO: 12 e domínio VL da SEQ ID NO: 17;

domínio VH da SEQ ID NO: 22 e domínio VL da SEQ ID NO: 27;

25 domínio VH da SEQ ID NO: 32 e domínio VL da SEQ ID NO: 37;

domínio VH da SEQ ID NO: 42 e domínio VL da SEQ ID NO: 47;

domínio VH da SEQ ID NO: 52 e domínio VL da SEQ ID NO: 57;

domínio VH da SEQ ID NO: 62 e domínio VL da SEQ ID
NO: 67;

domínio VH da SEQ ID NO: 72 e domínio VL da SEQ ID
NO: 77;

5 domínio VH da SEQ ID NO: 82 e domínio VL da SEQ ID
NO: 87;

domínio VH da SEQ ID NO: 92 e domínio VL da SEQ ID
NO: 97;

10 domínio VH da SEQ ID NO: 102 e domínio VL da SEQ ID
NO: 107;

domínio VH da SEQ ID NO: 112 e domínio VL da SEQ ID
NO: 117;

domínio VH da SEQ ID NO: 122 e domínio VL da SEQ ID
NO: 127;

15 domínio VH da SEQ ID NO: 132 e domínio VL da SEQ ID
NO: 137;

domínio VH da SEQ ID NO: 142 e domínio VL da SEQ ID
NO: 147;

20 domínio VH da SEQ ID NO: 152 e domínio VL da SEQ ID
NO: 157;

domínio VH da SEQ ID NO: 162 e domínio VL da SEQ ID
NO: 167;

domínio VH da SEQ ID NO: 172 e domínio VL da SEQ ID
NO: 177;

25 domínio VH da SEQ ID NO: 182 e domínio VL da SEQ ID
NO: 187; ou

domínio VH da SEQ ID NO: 192 e domínio VL da SEQ ID
NO: 197.

31. Elemento de ligação isolado para GM-CSFR α humano,

caracterizado pelo fato de que o elemento de ligação inibe a ligação de GM-CSF a GM-CSFR α e sendo que o elemento de ligação compreende uma molécula de anticorpo compreendendo um domínio VH de anticorpo compreendendo um conjunto de regiões determinadoras de complementaridade HCDR1, HCDR2 e HCDR3 e uma estrutura, sendo que o conjunto de regiões determinadoras de complementaridade compreende uma HCDR1 com seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 173, uma HCDR2 com seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 4, e uma HCDR3 com seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 85; SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 175; SEQ ID NO: 185; e SEQ ID NO: 195.

32. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 27 ou qualquer uma das reivindicações de 29 a 31, caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo é uma molécula de anticorpo humano ou humanizado.

33. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a estrutura de domínio VH é uma estrutura de DP47 VH3 ou DP5 VH1 de linhagem germinativa humana.

34. Elemento de ligação de acordo com a reivindicação 32 ou reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio VL sendo que a estrutura de domínio VL é uma estrutura VLambda 6_6a, VLambda 1 DPL3 ou VLambda 1 DPL8 de linhagem germinativa humana.

35. Molécula de anticorpo isolada para GM-CSFR α humano, caracterizada pelo fato de que inibe a ligação de GM-CSF a GM-CSFR α , e que compreende

um domínio VH com a seqüência de aminoácidos do domínio

VH mostrada na SEQ ID NO: 52 ou uma variante da mesma com uma ou duas alterações de aminoácidos, e

um domínio VL com a sequência de aminoácidos do domínio VL mostrada na SEQ ID NO: 57 ou um variante da mesma com uma ou duas alterações de aminoácidos;

sendo que as alterações de aminoácidos são selecionadas do grupo que consiste de substituições, inserções e deleções.

36. Elemento de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 27 ou de 29 a 34, ou uma molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 35, caracterizado(a) pelo fato de que a molécula de anticorpo é IgG4.

37. Elemento de ligação ou uma molécula de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 36, caracterizado(a) pelo fato de que se liga ao domínio extracelular de GM-CSFR α humano com uma afinidade (KD) de 1 nM ou menos em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície.

38. Elemento de ligação ou molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado(a) pelo fato de que se liga ao domínio extracelular de GM-CSFR α humano com uma afinidade (KD) de 0,5 nM ou menos em um ensaio de ressonância de plasmon de superfície.

39. Elemento de ligação ou molécula de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado(a) pelo fato de que apresenta uma potência de neutralização IC₅₀ de 60 pM ou menos em um ensaio de proliferação de células TF-1 com 7 pM de GM-CSF humano.

40. Elemento de ligação ou molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 38, caracterizado(a) pelo fato de que apresenta uma potência de neutralização IC₅₀ de 10 pM ou menos em um ensaio de proliferação de células TF com 7 pM de GM-CSF humano.

41. Elemento de ligação ou molécula de anticorpo de acordo

com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado(a) pelo fato de que apresenta uma potência de neutralização IC₅₀ de 50 pM ou menos em um ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos com 7 pM de GM-CSF humano.

5 42. Elemento de ligação ou molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 41, caracterizado(a) pelo fato de que apresenta uma potência de neutralização IC₅₀ de 25 pM ou menos em um ensaio de alteração de forma de granulócitos humanos com 7 pM de GM-CSF humano.

10 43. Elemento de ligação ou molécula de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado(a) pelo fato de que apresenta uma potência de neutralização IC₅₀ de 100 pM ou menos em um ensaio de liberação de TNF α de monócitos com 1 nM de GM-CSF humano.

15 44. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um elemento de ligação ou molécula de anticorpo como definido(a) em qualquer uma das reivindicações precedentes e um excipiente farmacologicamente aceitável.

20 45. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um elemento de ligação ou molécula de anticorpo como definido(a) em qualquer uma das reivindicações de 1 a 43.

46. Célula hospedeira *in vitro*, caracterizada pelo fato de que contém uma molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 43.

25 47. Método para produzir um elemento de ligação ou molécula de anticorpo como definido(a) em qualquer uma das reivindicações de 1 a 43, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar células hospedeiras como definidas na reivindicação 46.

48. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente purificar o elemento de ligação.

49. Método para produzir uma molécula de anticorpo para GM-CSFR α humano, caracterizado pelo fato de que compreende:

proporcionar, como inserção, deleção ou substituição de um ou mais aminoácidos na seqüência de aminoácidos de um domínio VH parental compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3, um domínio VH que é uma variante de seqüência de aminoácidos do domínio VH parental; sendo que

a CDR1 VH parental apresenta uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 3;

a CDR2 VH parental apresenta uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 4; e

a CDR3 VH parental apresenta uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 85; SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 185; e SEQ ID NO: 195; ou sendo que

a CDR1 VH parental apresenta uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 173, a CDR2 VH parental apresenta uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 174, e a CDR3 VH parental apresenta uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 175; e

opcionalmente combinar o domínio VH assim proporcionado com um ou mais domínios VL para proporcionar uma ou mais combinações VH/VL; e

testar o domínio VH ou a combinação ou combinações VH/VL para identificar uma molécula de anticorpo para GM-CSFR α humano.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que referido um ou mais domínios VL são proporcionados como inserção, deleção ou substituição de um ou mais aminoácidos na seqüência de

aminoácidos de um domínio VL parental compreendendo LCDR1, LCDR2 e LCDR3; sendo que

a CDR1 VL parental apresenta uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 8;

5 a CDR2 VL parental apresenta uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 9; e

a CDR3 VL parental apresenta uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 70, 10 SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 190 e SEQ ID NO: 200.

51. Método de acordo com a reivindicação 49 ou reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que compreende testar a molécula de anticorpo 15 quanto à capacidade de inibir ligação de GM-CSF humano a GM-CSFR α humano.

52. Método para produzir uma composição de molécula de anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende obter uma molécula de anticorpo usando um método como definido em qualquer uma das 20 reivindicações de 49 a 51, e formular a molécula de anticorpo em uma composição compreendendo pelo menos um componente adicional.

53. Uso de um elemento de ligação ou molécula de anticorpo como definido(a) em qualquer uma das reivindicações de 1 a 43, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para tratar 25 uma doença ou condição inflamatória, respiratória ou autoimune.

54. Uso de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença é artrite reumatóide, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, resposta alérgica, esclerose múltipla, leucemia mielóide ou aterosclerose.

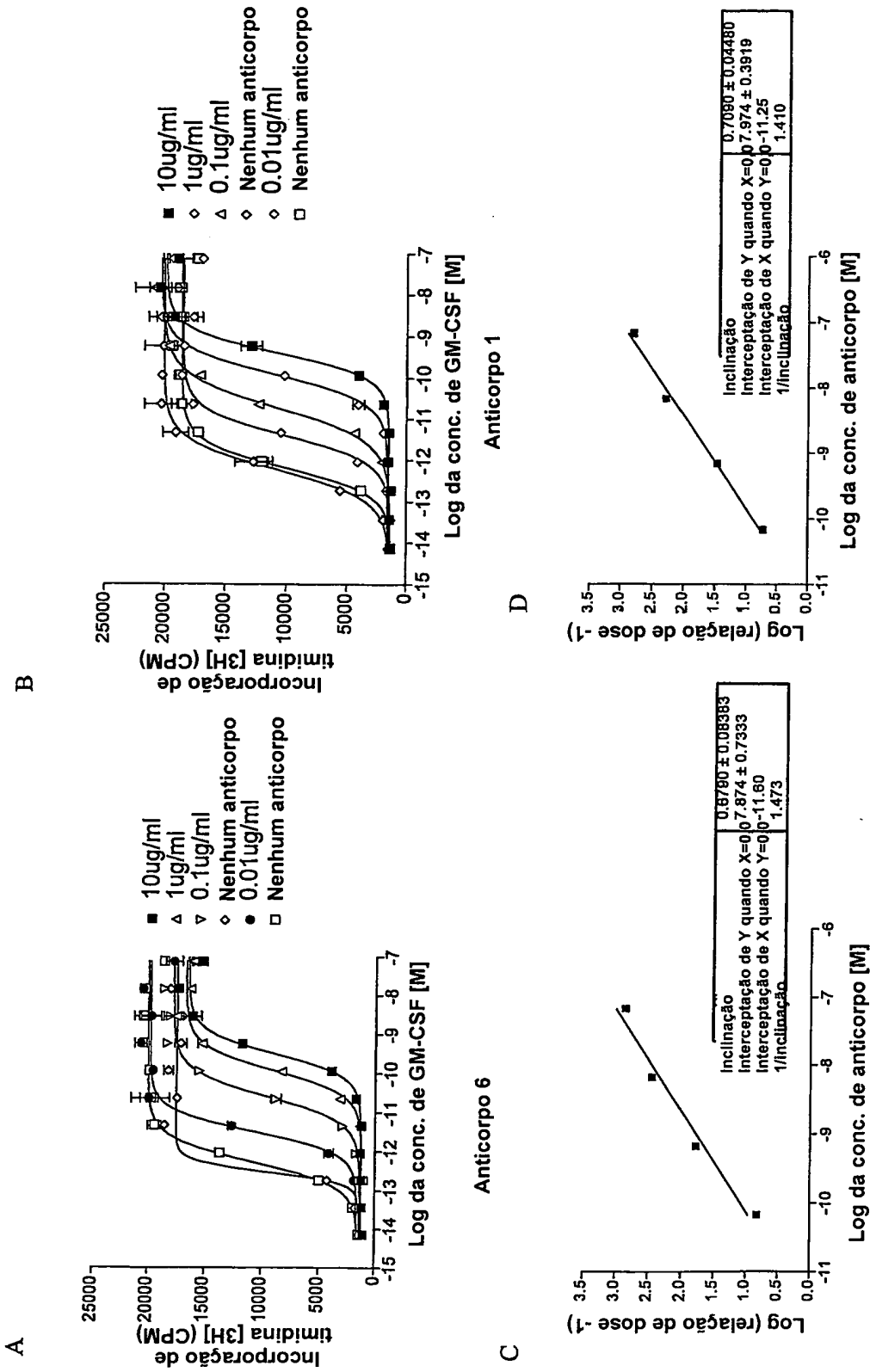


Figura 1

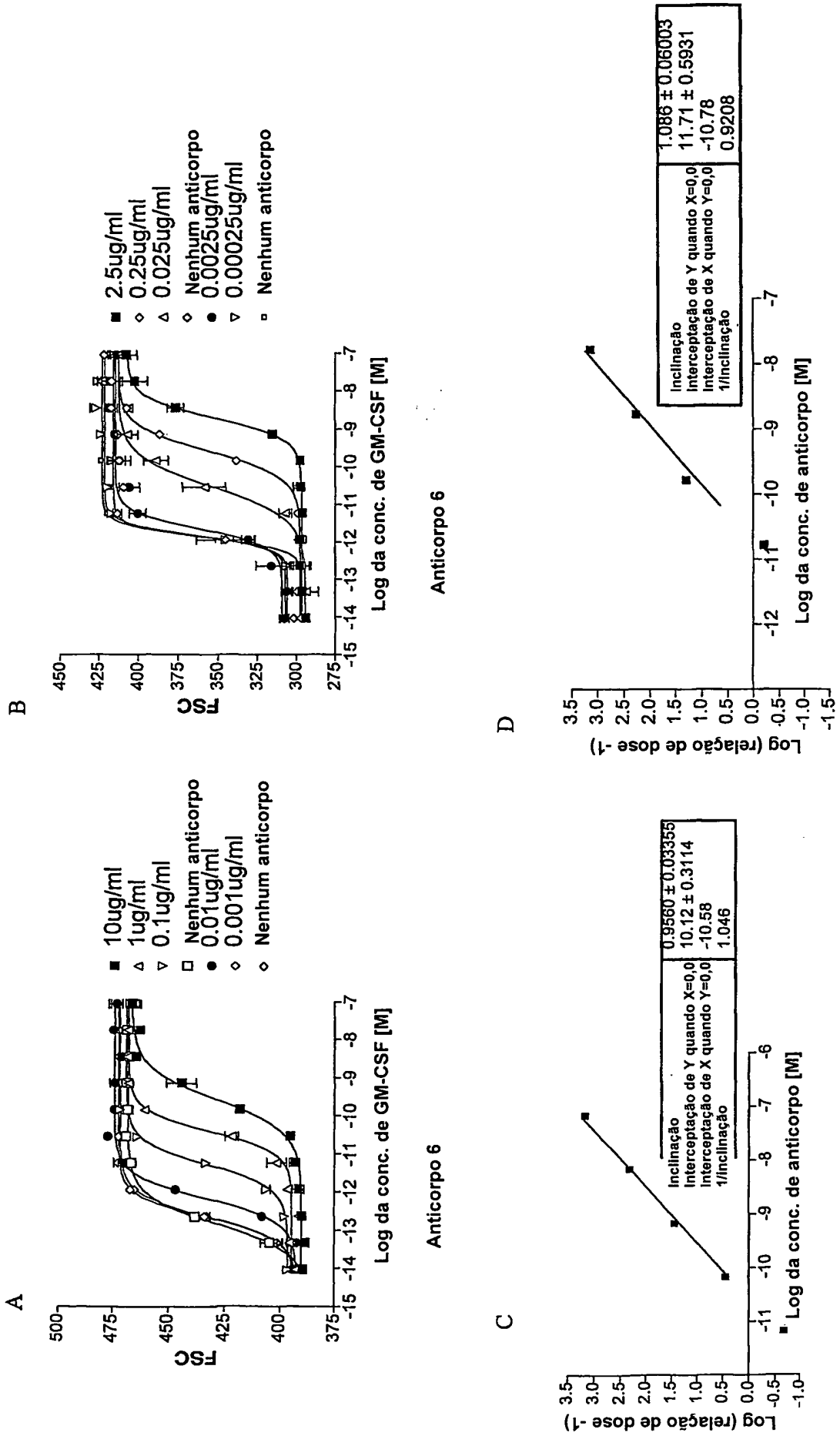


Figura 2

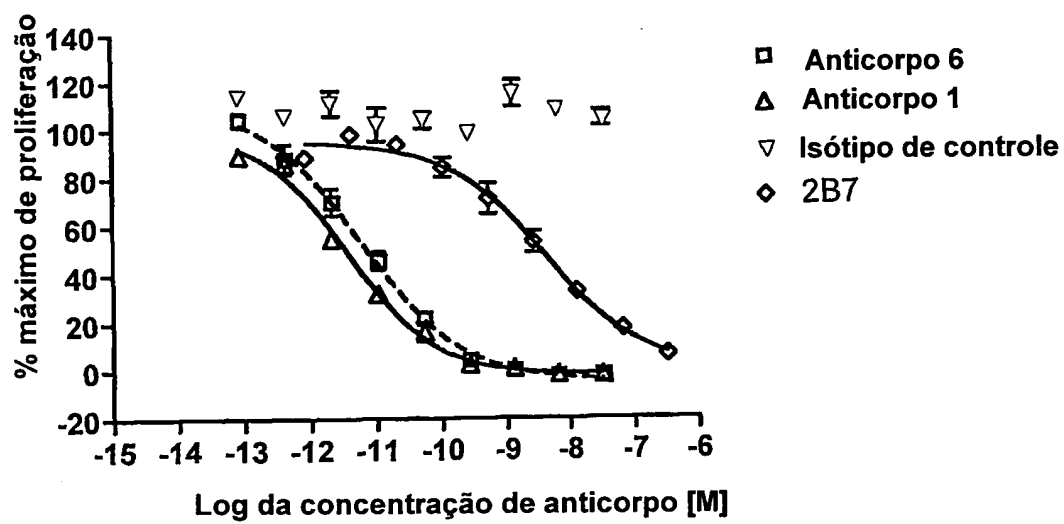


Figura 3

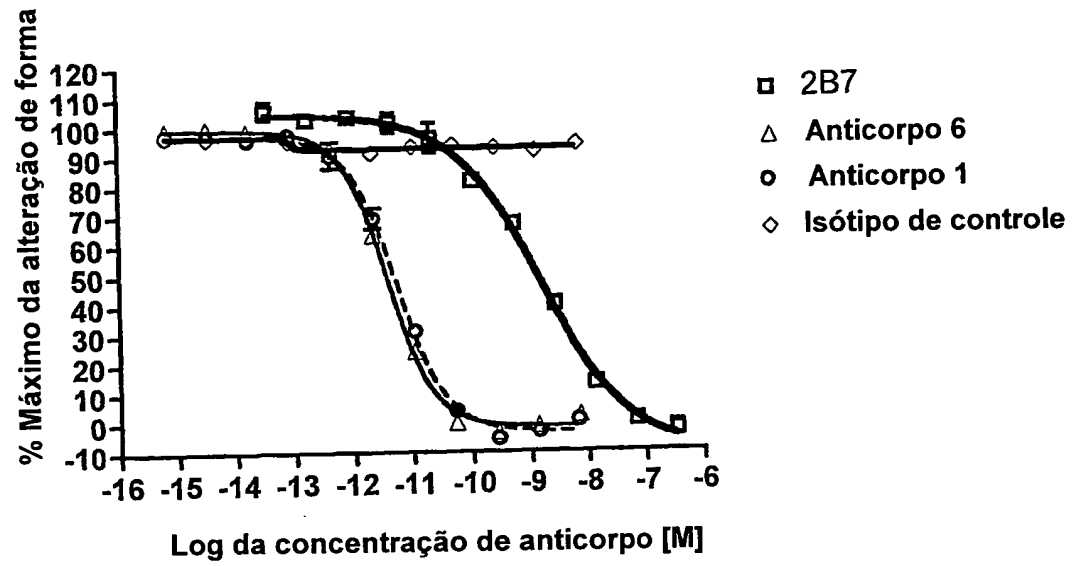


Figura 4

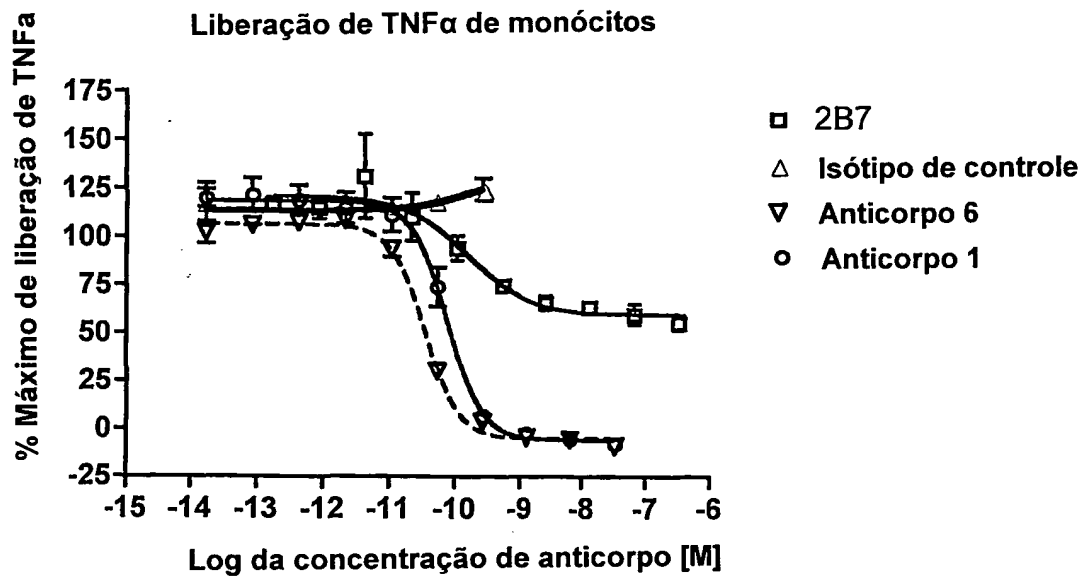


Figura 5

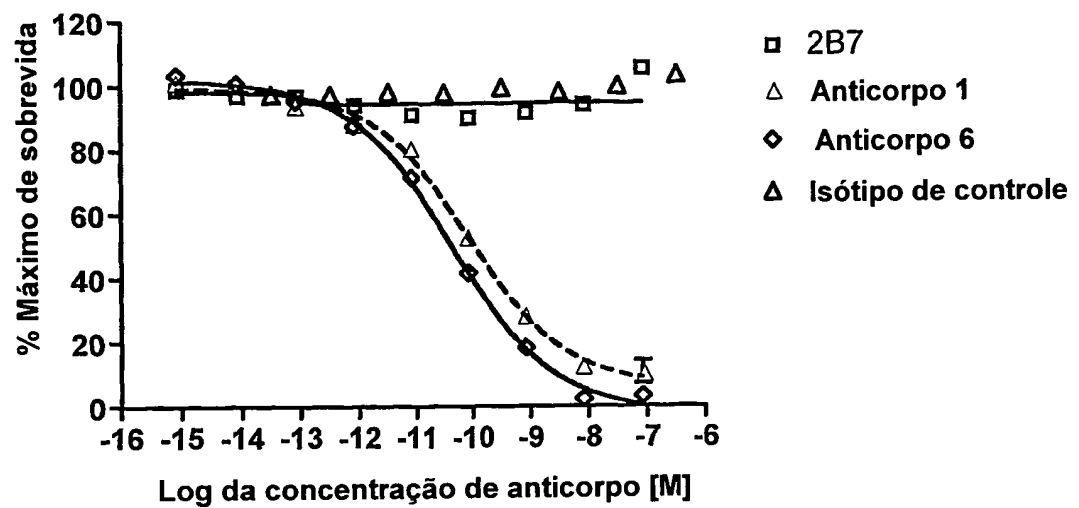


Figura 6

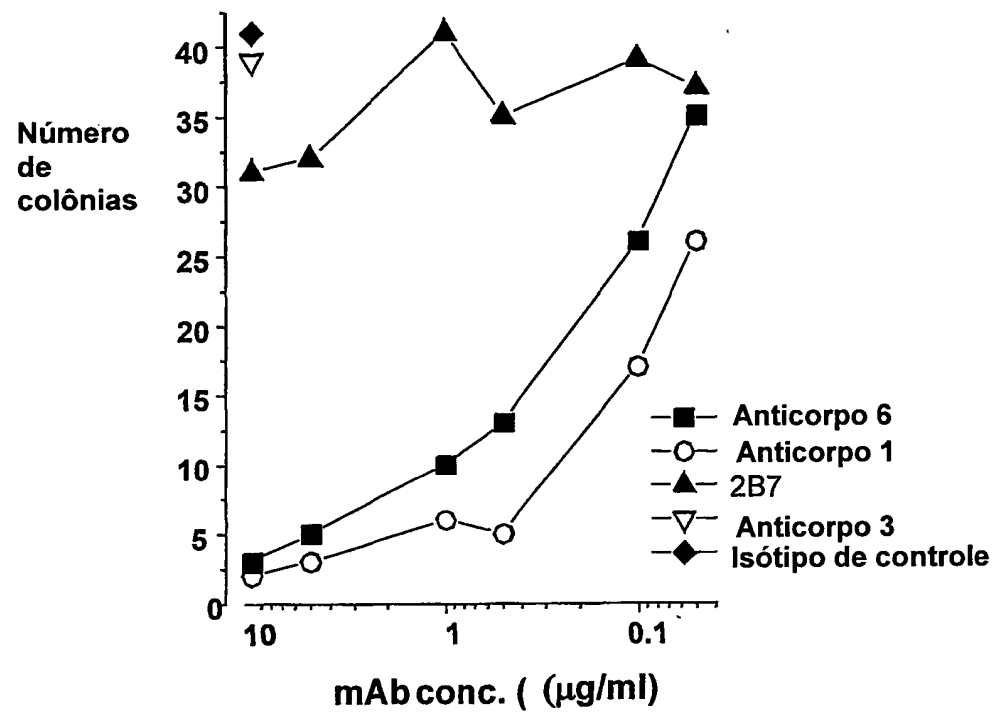


Figura 7

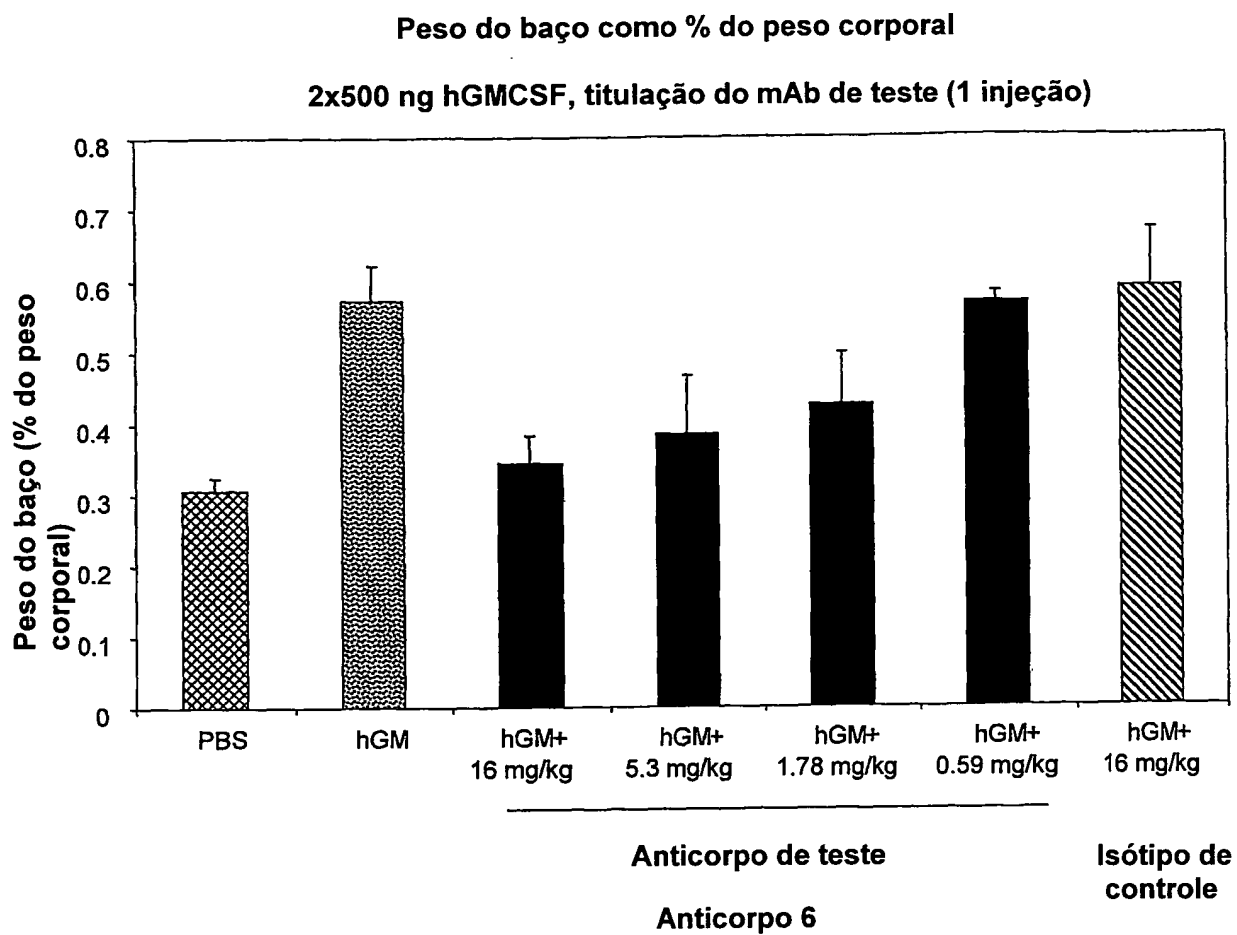
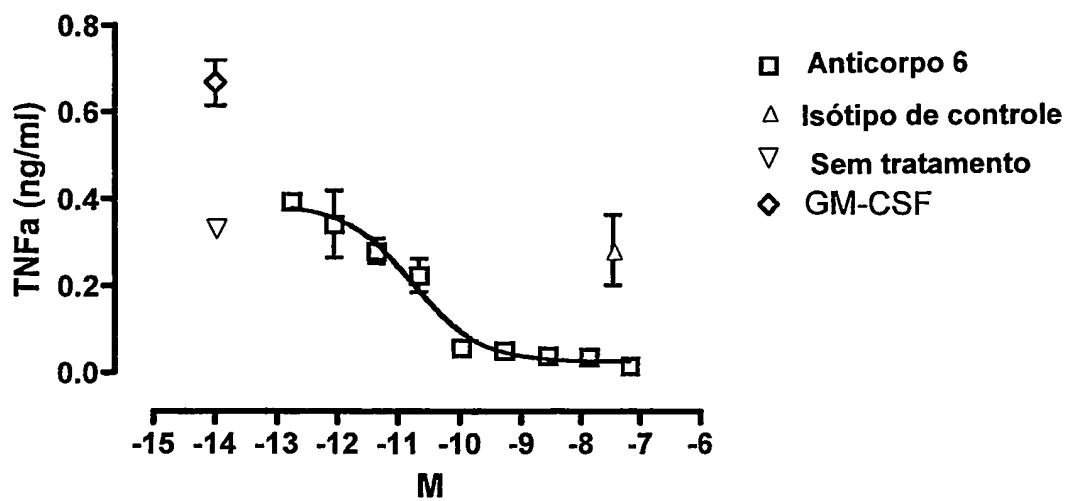


Figura 8

A



B

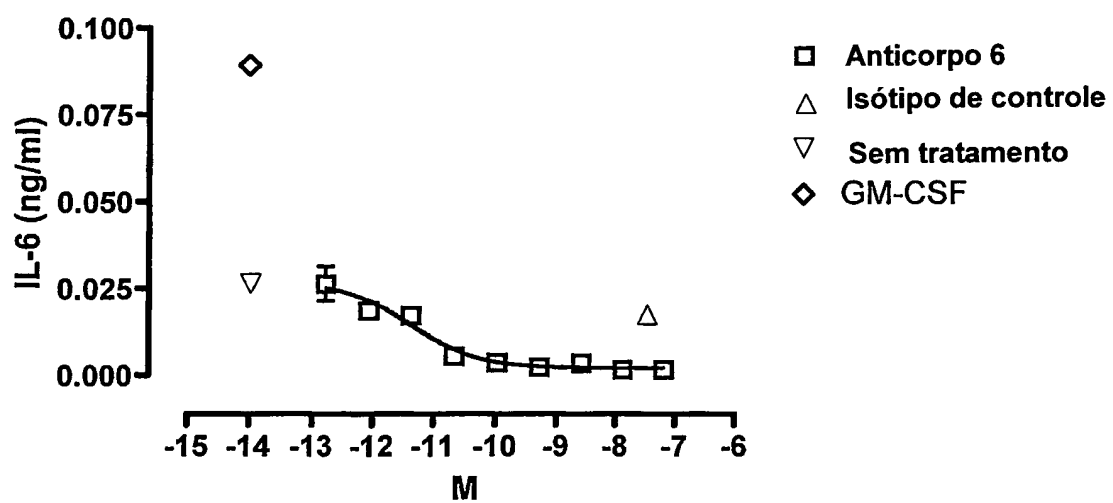


Figura 9

RESUMO

“ELEMENTO DE LIGAÇÃO ISOLADO, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, COMPOSIÇÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA *IN VITRO*, MÉTODO PARA
5 PRODUZIR UM ELEMENTO DE LIGAÇÃO OU MOLÉCULA DE ANTICORPO, E, USO DE UM ELEMENTO DE LIGAÇÃO OU MOLÉCULA DE ANTICORPO”

Elementos de ligação para cadeia alfa de receptor para fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF α),
10 especificamente moléculas de anticorpos. Uso dos elementos de ligação no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, p. ex. artrite reumatóide, asma, resposta alérgica, esclerose múltipla, leucemia mielóide e aterosclerose.