

(11) Número de Publicação: **PT 1874818 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/22 (2011.01) **G01N 33/68** (2011.01)
G01N 33/577 (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.04.20	(73) Titular(es): ELI LILLY AND COMPANY LILLY CORPORATE CENTER INDIANAPOLIS, IN 46285 US
(30) Prioridade(s): 2005.04.22 US 674082 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.01.09	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.04.13 086/2011	(72) Inventor(es): BRYAN EDWARD JONES US DAVID MATTHEW MARQUIS US YING TANG US JEFFRY DEAN WATKINS US LIHUA HUANG US
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA TGF BETA 1**

(57) Resumo:
SÃO DESCRITOS ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA TGF BETA 1 MADURO RELATIVAMENTE A TGF BETA 2 MADURO E A TGF BETA 3 MADURO. OS ANTICORPOS SÃO CARACTERIZADOS PELA CDR3 DA CADEIA PESADA GYRX1X2X3Y EM QUE X1 É W OU A, X2 É F OU L, X3 É A, E OU Y.

RESUMO

"ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA TGF BETA 1"

São descritos anticorpos específicos contra TGF Beta 1 maduro relativamente a TGF Beta 2 maduro e a TGF Beta 3 maduro. Os anticorpos são caracterizados pela CDR3 da cadeia pesada GYRX1X2X3Y em que X1 é W ou A, X2 é F ou L, X3 é A, E ou Y.

DESCRIÇÃO

" ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA TGF BETA 1 "

CAMPO DO INVENTO

O invento, de um modo geral, está relacionado com composições relacionadas com proteínas TGF Beta 1. Em particular, proporciona composições de ligação purificadas e reagentes relacionados úteis, e.g., no diagnóstico, tratamento e prevenção de alterações da proliferação celular, auto-imunes/inflamatórias, cardiovasculares e fibróticas e na avaliação dos efeitos de compostos exógenos na expressão de sequências de ácido nucleico e de aminoácidos de tais proteínas.

FUNDAMENTO DO INVENTO

O primeiro membro da super-família do factor de crescimento transformante beta (TGF-beta) de factores polipeptídicos secretados, TGF-Beta 1, foi descoberto há aproximadamente vinte anos. Subsequentemente, a família foi crescendo consideravelmente e agora compreende mais de trinta membros vertebrados e uma dúzia ou mais de proteínas estruturalmente e funcionalmente relacionadas em invertebrados, tais como vermes e moscas (ver e.g., Attisano & Lee-Hoeflich, 2001 Gen.Biol. 2, review 30101;

Moustakas *et al.*, 2001 *J. Cell Sci.* 114:4359; Wrana, 2000 *Cell* 100:189). Os membros da família de TGF Beta controlam muitas funções celulares e a sua actividade é crítica para a regulação de numerosos processos de desenvolvimento e homeostáticos. As experiências revelaram que existe uma via de sinalização de TGF-Beta conservada entre vertebrados, vermes e moscas.

Um membro desta família, TGF Beta 1, está envolvido numa variedade de processos celulares tais como, por exemplo, proliferação e diferenciação celulares, migração, diferenciação, apoptose, desenvolvimento embrionário, formação da matriz extracelular, desenvolvimento do osso, cicatrização de feridas, hematopoiése e respostas imunes e inflamatórias (ver, *e.g.*, Roberts & Sporn 1990 *Peptide Growth Factors and Their Receptors*, pp. 419-72, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany; Massagué, J. 1998 *Annu. Rev. Biochem.* 67:753).

Ainda, os dados pré-clínicos e clínicos indicam que TGF-Beta 1 é um dos principais contribuintes para a deposição de proteína da matriz na fibrose intersticial e que está envolvido na iniciação e progressão de uma série de estados de doença fibrótica associados, incluindo fibrose renal - a qual é comum a todas as formas de doença renal crónica (CDR). O grau de fibrose renal está positivamente correlacionado com a progressão para falência renal crónica (CRF, também conhecida como doença renal terminal (ESRD)) e pode resultar em morte, diálise crónica ou transplante renal.

TGF Beta está associado a CRF através de eventos complexos e diversos que têm impacto na maioria das células do rim (Bottinger, 2002, J. Am. Soc. Nephrol. 13:2600). Estes eventos acabam por resultar em fibrose tubulointersticial e glomeruloesclerose conduzindo à perda da função do nefrónio e por fim à falência renal crónica. Das três isoformas de TGF-Beta, TGF-Beta 1 parece predominar na mediação da progressão de doença renal crónica, não só por ser a isoforma mais predominantemente expressa, como também por TGF-Beta 2 e TGF-Beta 3 parecerem mediar os seus efeitos através da regulação positiva da expressão de TGF-Beta 1 (Yu, 2003, Kid. Int. 64, 844). Consequentemente, para prevenir os efeitos nefastos de alterações tais como CRD, existe a necessidade de modular a expressão de TGF Beta 1.

A Publicação Internacional N° WO2005/010049 descreve anticorpos monoclonais específicos para TGF-Beta 1 não para TGF-Beta 2 ou TGF-Beta 3, e que neutralizam TGF-Beta 1.

Assim, a descoberta de novas composições de ligação a TGF-Beta 1 satisfaz a necessidade registada ao proporcionar composições que são úteis no diagnóstico, prevenção e tratamento de alterações fibróticas tais como doença renal crónica.

SUMÁRIO DO INVENTO

O invento baseia-se em parte na descoberta de composições de ligação com melhores propriedades que especificamente e/ou selectivamente se ligam a TGF Beta 1 maduro e não a TGF Beta 2 maduro e/ou TGF Beta 3 maduro e que neutralizam TGF Beta 1 maduro.

O presente invento proporciona um anticorpo, ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, de acordo com a reivindicação 1.

O presente invento ainda proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo, ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, do invento e um veículo farmaceuticamente aceitável.

O presente invento também proporciona um anticorpo, ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, do invento para usar no tratamento de uma doença fibrótica num ser humano.

O presente invento proporciona ainda um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, do invento para usar no tratamento de uma doença renal crónica num ser humano.

O presente invento ainda proporciona um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, do

invento para usar em terapia de combinação para o tratamento de uma doença fibrótica num ser humano, em que o referido anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio é administrado em combinação com um inibidor ACE.

O presente invento ainda proporciona um anticorpo, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, para usar em terapia de combinação no tratamento de uma doença renal crónica num ser humano, em que o referido anticorpo, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, é administrado em combinação com um inibidor ACE.

O presente invento ainda proporciona um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, do invento para usar no tratamento de cancro.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS REALIZAÇÕES PREFERIDAS

1. Geral

Deve ser entendido que este invento não se limita a composições, métodos e técnicas particulares aqui descritas, uma vez que tais composições, métodos e técnicas podem, certamente, variar. Também deve ser entendido que a terminologia aqui usada é apenas para descrever realizações particulares e não pretende limitar o âmbito do invento, o qual está apenas limitado pelas reivindicações apensas.

Como aqui usado, incluindo as reivindicações

apenas, formas singulares de palavras tais como "um", "o" e "a" incluem, e.g., os correspondentes plurais a menos que de outra forma seja explicitado. Assim, por exemplo, a referência a "um organismo" inclui, e.g., um ou mais organismos diferentes, a referência a "uma célula" inclui, e.g., uma ou mais dessas células e a referência a "um método" inclui, e.g., referência a passos equivalentes e métodos conhecidos dos familiarizados com matéria, etc.

A menos que de outra forma seja definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados possuem o mesmo significado normalmente aceite pelos familiarizados com a área em que este invento se insere. Ainda que métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser usados na realização ou ensaios do invento, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências aqui discutidas são proporcionadas apenas pela sua descrição antes da data de entrega do presente pedido. Nada aqui deve ser pensado como uma admissão de que o invento não está habilitado a usar qualquer uma dessas descrições devido à sua invenção anterior. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências aqui referidas são incluídas como referência na sua totalidade relativamente aos ensinamentos pelos quais são referidos (como o contexto claramente dita), incluindo todas as figuras, desenhos, fotografias, gráficos, hiperligações e outra forma de código executável com motor de busca.

II. Definições

Uma **"composição de ligação"** é uma entidade molecular com afinidade de ligação selectiva e/ou específica para pelo menos uma outra entidade molecular ou parceiro de ligação. Tipicamente, a associação estará na interacção natural fisiologicamente relevante, covalente ou não covalente, e pode incluir membros de um complexo de múltiplas proteínas, incluindo, sem limitações, compostos veículo, parceiros de dimerização ou de multimerização. Uma composição de ligação pode ser natural (e.g., isolada e/ou purificada) ou produzida sinteticamente, na sua totalidade ou em parte. Tipicamente, uma composição de ligação possui pelo menos uma região como seja, como exemplo, uma área de superfície, uma forma (como seja, e.g., uma cavidade, fenda, fresta ou saliência), um arranjo molecular ou uma configuração espacial que especificamente e/ou selectivamente "se encaixa com", " se liga a" ou é "complementar de" uma organização espacial particular e/ou organização polar de uma área ou região num parceiro de ligação. Assim, por exemplo, quando uma composição de ligação está suficientemente próxima de um potencial parceiro de ligação, a composição e parceiro de ligação ligar-se-ão um ao outro especificamente e/ou selectivamente. Exemplos não limitantes de uma composição de ligação emparelhada com um parceiro de ligação incluem: antigénio-anticorpo e local de ligação ao hapteno. Exemplos não limitantes de composições de ligação de anticorpo incluem: anticorpos, diacorpos,

triacorpos, tetracorpos, minicorpos, fragmentos Fab (incluindo, por exemplo, e.g., Fabs diméricas ou triméricas), fragmentos Fv, fragmentos scFv, fragmentos F(ab)2, etc. (ver, e.g., Hudson & Souriau 2003 Nature Medicine 9:129-34 para exemplos não limitantes de composições de ligação de anticorpos abrangidas pelo invento). Uma composição de ligação de anticorpos monoclonais é um monoclonal no sentido de derivar de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos (*i.e.*, os anticorpos individuais que constituem a população são substancialmente idênticos (e.g., podem derivar de um clone de uma única célula)). No entanto, não se pretende limitar a uma origem particular. Tal anticorpo pode ser facilmente produzido em células que normalmente não produzem anticorpos, tais como células CHO, NSO ou COS. Ainda, tal anticorpo pode ser produzido noutros tipos celulares, especialmente células de mamífero e mesmo células de plantas, através da manipulação genética de tais células de forma a expressarem e montarem as cadeias leve e pesada do polipéptido formando o produto anticorpo. Ainda, tais cadeias podem ser sintetizadas quimicamente mas, uma vez que serão específicas de um determinado determinante antigénico, ainda constituirão um anticorpo "monoclonal" dentro do espírito em que esse termo é aqui usado. Assim, como aqui é usado, o termo anticorpo monoclonal destina-se a significar mais a especificidade e pureza das moléculas de anticorpo do que o mero mecanismo usado para a produção dos referidos anticorpos.

"Um local de ligação" é uma região, área ou configuração específica de uma entidade molecular que faz parte da ligação específica e/ou selectiva com uma outra entidade molecular. Um exemplo não limitante de um local de ligação é a sequência de aminoácidos contígua compreendendo uma região determinante de complementaridade (CDR) de um anticorpo. Numa realização, um local de ligação do invento compreende a sequência com a fórmula mostrada na Tabela 1. Numa outra realização não limitante, um local de ligação compreende uma combinação das sequências na Tabela 1. Um outro exemplo não limitante é um local de ligação formado a partir da configuração tridimensional e da organização espacial das sequências de aminoácidos compreendendo as seis ansas CDR da região variável das cadeias pesada e leve na margem do barril de oito cadeias beta de um fragmento Fab (ver, e.g., Clothia & Lesk, 1987 J. Mol. Biol. 196:901-17). Uma CDR descrita no invento pode ser incorporada/embebida numa região estrutural ou estrutura molecular como seja, por exemplo, como efectuado nos enxertos de CDR. Numa realização, a estrutura para inserção da CDR do invento será, de um modo geral, uma sequência da cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou porção substancial da mesma, em que a CDR fica situada numa localização correspondente à CDR dos domínios variáveis VH e VL do anticorpo natural codificado pelos genes de imunoglobulinas rearranjados. As estruturas e localizações dos domínios variáveis de imunoglobulina podem ser determinados por referência a Kabat et al., 1987 Sequences of proteins of Immunological Interest. 4th Ed. US

Department of Health and Human Services e actualizações das mesmas, agora disponíveis na Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu>)). As CDRs são, de um modo geral, como definido por Kabat mas podem também ser instruídos pelas definições de Chothia (J. Mol.Biol. 196:901-17) e/ou MacCallum (J. Mol. Biol. 262:732-45). Os familiarizados com a área podem de rotina determinar quais os resíduos que compreendem uma CDR particular considerando a sequência de aminoácidos da região variável em que é inserida. Ainda, no enxerto de CDRs os resíduos da ansa definida por Chothia adjacente a VH CDR1 de Kabat podem ser enxertados.

Numa realização, as sequências CDR do invento podem ser introduzidas num reportório de domínios variáveis sem as regiões CDR, usando tecnologia de DNA recombinante. Por exemplo, Marks et al. (1992 BioTechnology 10:779-83) descrevem métodos de produção de reportórios de domínios variáveis de anticorpo em que sequências iniciadoras de consenso dirigidas ou adjacentes ao extremo 5' da área do domínio variável são usadas conjuntamente com sequências iniciadoras de consenso para a terceira região estrutural dos genes VH humanos para proporcionar um reportório de domínios VH variáveis sem uma CDR3. Marks et al. ainda descrevem como este reportório pode ser combinado com uma CDR3 de um anticorpo particular (como aqui descrito). Usando técnicas análogas, as sequências CDR3 do presente invento podem ser receber reportórios de domínios VH ou VL sem uma CDR3 e os domínios VH ou VL completos combinados com um domínio VL ou VH cognato para proporcionar membros

de composições de ligação específicos do invento. Como alternativa, as sequências CDR3 podem ser combinadas com outras CDRs do invento usando uma estratégia semelhante. O relatório pode então ser apresentado num sistema hospedeiro adequado, como seja o sistema de apresentação fágica de W092/01047, de forma a puderem ser seleccionados membros de ligação específicos adequados.

Complexo composição de ligação:TGF Beta 1

O termo "**complexo composição de ligação:TGF Beta 1**", como aqui é usado, refere-se a um complexo de uma composição de ligação e proteína TGF Beta 1 formado através da ligação específica e/ou selectiva da composição de ligação à proteína TGF Beta 1. Numa realização preferida, o TGF Beta 1 referido ao longo da descrição é uma proteína TGF Beta 1 de primata "madura". Numa realização mais preferida, o TGF Beta 1 referido ao longo da descrição é uma proteína TGF Beta 1 humana madura (ver, e.g., NCBI N° de acesso: P01137, a qual descreve a sequência de aminoácidos do precursor do factor de crescimento transformante humano beta 1 (TGF-beta 1) e a sua porção madura). Em todos os casos, o TGF Beta 1 referido é TGF Beta 1 na sua forma madura biologicamente activa [(TGF Beta 1 é libertado das células como um complexo "latente" inactivo, compreendendo um homodímero de TGF Beta 1 num complexo não covalente com dois pró-segmentos, ao qual uma de várias proteínas de ligação a TGF Beta 1 latente está muitas vezes ligada (ver, e.g., Annes et al., 2003 J. Cell

Science 116:217-24; Miyazono, et al., 1993 Growth Factors 8:11-22; Munger et al., 1997 Kidney Int. 51:1376-82; Oklu & Hesketh 2000 Biochem. J. 352:601-10). Este complexo TGF Beta 1 latente representa uma segurança importante contra activação "inadvertida" e pode estabilizar e conduzir TGF beta 1 latente para a matriz extracelular, onde é sequestrado (Taipale, et al., 1998 Adv. Cancer Res. 75:87-134). A matriz extracelular actua assim como um reservatório a partir do qual TGF-Beta 1 pode ser facilmente activado sem necessidade de nova síntese celular. A secreção de TGF Beta 1 como um complexo latente necessita da existência de um processo de activação regulado, o qual é mais provavelmente mediado através das actividades das proteases que preferencialmente degradam os pró-segmentos de TGF Beta 1 e assim libertam a forma de dímero de TGF-Beta 1 activo, maduro, altamente estável)].

A ligação específica da composição de ligação significa que a composição de ligação possui um local de ligação que reconhece uma região de TGF Beta 1, tipicamente na sua conformação activa nativa. Por exemplo, os anticorpos induzidos contra um TGF Beta 1 e que reconhecem um epitopo de TGF Beta 1 são capazes de formar um complexo de composição de ligação:TGF Beta 1 através da ligação específica. Tipicamente, a formação de um complexo proteico da composição de ligação:TGF Beta 1 permite a medição de TGF Beta 1 numa amostra biológica, e.g., uma mistura com outras proteínas e moléculas biológicas permite a medição de TGF Beta 1 numa amostra biológica, e.g., uma mistura com

outras proteínas e moléculas biológicas. Um epitopo de uma composição de ligação do invento pode ser determinado usando técnicas aqui descritas ou conhecidas na área (ver e.g., G. Tribbick 2002 Journal of Immunological Methods 267:27-35; Woods & Hamuro 2001 Journal of Cellular Biochemistry Supplement 37:89-98) e/ou como determinado pela ligação competitiva como aqui descrito. Numa realização preferida, um epitopo de uma composição de ligação do invento compreende os resíduos de aminoácidos YYVGRK de SEQ ID NO:1; numa outra realização, um epitopo de uma composição de ligação do invento compreende os resíduos de aminoácidos YYVGRK de SEQ ID NO:1 e YSKV de SEQ ID NO:1; numa realização adicional, um epitopo de uma composição de ligação do invento compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 resíduos (contíguos ou não contíguos) de YYVGRK de SEQ ID NO:1 e/ou pelo menos 1, 2, 3 ou 4 resíduos (contíguos ou não contíguos) de YSKV de SEQ ID NO:1 (tal realização está abrangida para incluir qualquer uma e todas as combinações dos mesmo, tais como e.g., sem limitação: YYVGRK e KV de SEQ ID NO:1 (todas essas combinações estão disponíveis usando apenas um algoritmo de computador e fórmulas matemáticas bem conhecidas para permutações e combinações). Ainda numa outra realização preferida, um epitopo do invento é definido funcionalmente, por exemplo, através da capacidade de uma composição de ligação do invento para prevenir a formação de um complexo de ligação subsequente através da competição de composições de ligação para o mesmo antigénio como seja, e.g., TGF Beta 1 (tal ligação competitiva está aqui descrita).

O termo "ligação específica" como aqui usado refere-se à situação em que um membro de um par de ligação específico não apresentará ligação significativa a moléculas que não sejam os seus parceiros de ligação específicos. O termo é também aplicável quando, *e.g.*, um domínio de ligação ao antigénio é específico de um epitopo particular que existe numa série de antigénios, neste caso o membro de ligação específico portador do domínio de ligação ao antigénio será capaz de se ligar a vários antigénios portadores do epitopo. Assim, uma composição de ligação específica para TGF Beta 1 "não apresentará qualquer ligação significativa a moléculas diferentes dos seus parceiros de ligação específicos" ou seja TGF Beta 1 maduro.

As frases **"liga-se especificamente"** ou **"especificamente imuno-reactivos com"**, relativamente a uma composição de ligação, refere-se a uma reacção de ligação que é determinante da presença da composição de ligação na presença de uma população heterogénea de proteínas e outros componentes biológicos. Assim, em condições de imunoensaio designadas, a composição de ligação especificada liga-se a uma proteína específica e não se liga significativamente a outras proteínas presentes na amostra. A ligação específica a uma composição de ligação nessas condições pode requerer uma composição de ligação que é seleccionada pela sua especificidade para uma proteína particular. Por exemplo, uma composição de ligação, como seja um anticorpo, pode ser

induzido contra a forma de dímero activo humano do TGF Beta 1, cuja sequência de aminoácidos do monómero maduro está descrita em [SEQ ID NO:1], e subsequentemente seleccionado para se obter anticorpos especificamente imuno-reactivos com a proteína TGF Beta 1 e não com outras proteínas. Tal composição de ligação poderá diferenciar proteínas altamente homólogas da proteína TGF Beta 1 humana, e.g., como seja, por exemplo, outras isoformas de TGF Beta humano (e.g., como seja, TGF Beta 2 humano ou TGF Beta 3 humano). Numa realização preferida, a especificidade de uma composição de ligação do invento para TGF Beta 1 madura é igual ou maior que 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 ou 10000 vezes relativamente à sua especificidade para TGF Beta 2 maduro e/ou TGF Beta 3 maduro. Numa outra realização preferida, a especificidade de uma composição do invento pode ter um valor de especificidade particular para TGF Beta 2 humano da lista atrás apresentada e um valor de especificidade diferente para TGF Beta 3 humano como tal, por exemplo, uma especificidade para TGF Beta 1 madura que é igual ou superior a 100 vezes a sua especificidade relativa para TGF Beta 2 e igual ou superior a 900 vezes a sua especificidade relativa para TGF Beta 3 maduro. Qualquer uma destas combinações está incluída.

Uma composição de ligação do invento preferencialmente neutraliza TGF Beta 1 e possui uma constante de dissociação (K_d) para TGF Beta 1 preferencialmente inferior a cerca de: 40 pM, 35 pM, 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 14 pM, 13 pM, 12 pM, 11 pM ou 10 pM; mais de preferência menos de aproximadamente: 10 pM, 9,9 pM, 9,8 pM, 9,7 pM, 9,6 pM, 9,5 pM, 9,4 pM, 9,3 pM, 9,2 pM, 9,1 pM, 9,0 pM, 8,9 pM, 8,8 pM, 8,7 pM, 8,6 pM, 8,5 pM, 8,4 pM, 8,3 pM, 8,2 pM, 8,1 pM, 8,0 pM, 7,9 pM, 7,8 pM, 7,7 pM, 7,6 pM, 7,5 pM, 7,4 pM, 7,3 pM, 7,2 pM, 7,1 pM, 7,0 pM, 6,9 pM, 6,8 pM, 6,7 pM, 6,6 pM, 6,5 pM, 6,4 pM, 6,3 pM, 6,2 pM, 6,1 pM, 6,0 pM, 5,9 pM, 5,8 pM, 5,7 pM, 5,6 pM, 5,5 pM, 5,4 pM, 5,3 pM, 5,2 pM, 5,1 pM ou 5,0 pM; mesmo mais de preferência inferior a cerca de 5,0 pM, 4,9 pM, 4,8 pM, 4,7 pM, 4,6 pM, 4,5 pM, 4,4 pM, 4,3 pM, 4,2 pM, 4,1 pM, 4,0 pM, 3,9 pM, 3,8 pM, 3,7 pM, 3,6 pM, 3,5 pM, 3,4 pM, 3,3 pM, 3,2 pM, 3,1 pM, 3,0 pM, 2,9 pM, 2,8 pM, 2,7 pM, 2,6 pM, 2,5 pM, 2,4 pM, 2,3 pM, 2,2 pM, 2,1 pM, 2,0 pM, 1,9 pM, 1,8 pM, 1,7 pM, 1,6 pM, 1,5 pM, 1,4 pM, 1,3 pM, 1,2 pM, 1,1 pM, 1,0 pM; e mesmo mais de preferência 9,9 pM, 9,8 pM, 9,7 pM, 9,6 pM, 9,5 pM, 9,4 pM, 9,3 pM, 9,2 pM, 9,1 pM, 9,0 pM, 8,9 pM, 8,8 pM, 8,7 pM, 8,6 pM, 8,5 pM, 8,4 pM, 8,3 pM, 8,2 pM, 8,1 pM, 8,0 pM, 7,9 pM, 7,8 pM, 7,7 pM, 7,6 pM, 7,5 pM, 7,4 pM, 7,3 pM, 7,2 pM, 7,1 pM, 7,0 pM, 6,9 pM, 6,8 pM, 6,7 pM, 6,6 pM, 6,5 pM, 6,4 pM, 6,3 pM, 6,2 pM, 6,1 pM, 6,0 pM, 5,9 pM, 5,8 pM, 5,7 pM, 5,6 pM, 5,5 pM, 5,4 pM, 5,3 pM, 5,2 pM, 5,1 pM, 5,0 pM, 5,0 nM, 4,9 pM, 4,8 pM, 4,7 pM, 4,6 pM, 4,5 pM, 4,4 pM, 4,3 pM, 4,2 pM, 4,1 pM, 4,0 pM, 3,9 pM, 3,8 pM, 3,7 pM, 3,6 pM, 3,5 pM, 3,4 pM, 3,3 pM, 3,2 pM, 3,1 pM, 3,0 pM,

2,9 pM, 2,8 pM, 2,7 pM, 2,6 pM, 2,5 pM, 2,4 pM, 2,3 pM, 2,2 pM, 2,1 pM, 2,0pM, 1,9 pM, 1,8pM, 1,7 pM, 1,6 pM, 1,5 pM, 1,4pM, 1,3 pM, 1,2 pM, 1,1 pM, 1,0 pM, 0,9 pM, 0,8 pM, 0,7 pM, 0,6 pM, 0,5 pM, 0,4 pM, 0,3 pM, 0,2 pM, 0,1 pM ou 0,01 pM. A constante de dissociação (K_d) de uma composição de ligação pode ser determinada usando qualquer método da área, por exemplo, por BIAcore™, adaptando o método de Karlsson et al., 1991 J. Immunol. Methods 145, 299-340. Para outras descrições, ver Jonsson, et al., 1993 Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson et al., 1991 Biotechniques 11:620-7; Johnsson, et al., 1995 J. Mol. Recognit. 8 :125-31 ; e Johnsson, et al. 1991 Anal. Biochem. 198 :268-77.

O termo " K_{on} ", como aqui usado destina-se a referir a constante de associação ou de velocidade, ou velocidade de reacção específica, da reacção directa ou de formação do complexo, medida em unidades: M-lseg-1. O termo " K_{off} ", como aqui usado, destina-se a referir a constante de dissociação ou velocidade de dissociação, para a dissociação de um anticorpo do complexo anticorpo/antigénio, medido em unidades: 1/segundo. O termo " K_d ", como aqui usado, destina-se a referir a constante de dissociação de uma interacção particular anticorpo-antigénio. É calculado pela fórmula: $K_{off}/K_{on} = K_d$. A afinidade de uma composição de ligação é frequentemente mais correlacionada com um K_{off} mais baixo do que com um K_{on} mais elevado, no entanto, não estando ligado a qualquer teoria, estão incluídas realizações com melhores K_{off} e K_{on} . Numa realização mais preferida, as composições de ligação

do presente invento são anticorpos ou fragmentos dos mesmos de elevada potência, de um modo geral apresentando baixos valores de K_{off} . Numa realização ainda mais preferida, a taxa K_{on} de uma realização Fab do invento tem uma taxa K_{on} melhorada pelo menos 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3 ou 2,4 vezes relativamente a um Fab comparável como seja, e.g., o mAb2471 descrito na Publicação Internacional N° WO2005/010049. Numa outra realização, uma composição do invento possui uma taxa de K_{off} melhorada ou seja de pelo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 130, 150, 195, 200, 225, 250, 260, 270, 280, 290 ou 300 vezes relativamente a uma composição de ligação comparável (e.g., como seja Fab ou mAb).

De preferência, uma composição de ligação de anticorpo liga-se especificamente e/ou selectivamente a TGF Beta 1 comparativamente a TGF Beta 2 e/ou TGF Beta 3; mais de preferência, uma composição de ligação de anticorpo que se liga especificamente e/ou selectivamente a TGF Beta 1 humano comparativamente com TGF Beta 2 humano e/ou TGF Beta 3 humano. De preferência, tal anticorpo possui menos de aproximadamente 20% de reactividade cruzada com TGF Beta 2 e/ou TGF Beta 3 (conforme medido pela razão das constantes de dissociação), mais de preferência menos de aproximadamente 15% de reactividade cruzada e mesmo mais de preferência ter menos de aproximadamente 10% de reactividade cruzada; e mesmo mais de preferência menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1% de reactividade cruzada.

Ainda, uma composição de ligação de anticorpo de preferência reconhece a forma activa mas não a latente de TGF Beta 1; mais de preferência a forma activa mas não a latente de TGF Beta 1 humano.

Neutralização

O termo "**neutraliza**" ou "**antagoniza**" relativamente a uma composição de ligação refere-se à situação em que a ligação específica e/ou selectiva de uma composição de ligação a uma outra entidade molecular resulta na inibição da função efectora biológica da entidade molecular ligada pela composição de ligação. Relativamente a TGF Beta 1, o termo "**neutraliza**" ou "**antagoniza**" destina-se a referir uma composição de ligação cuja ligação ou interacção a TGF Beta 1 resulta na inibição de uma actividade biológica induzida por TGF Beta 1. A inibição da actividade biológica de TGF Beta 1 pode ser avaliada através da medição de um ou mais indicadores *in vitro* ou *in vivo* da actividade biológica de TGF Beta 1, por exemplo, sem limites, inibição da ligação a receptores, inibição da fibrose, inibição de quimiotaxia ou inibição da transdução de sinal num ensaio de ligação de TGF Beta 1 (ver, e.g., EP 0945464 para exemplos não limitantes dos ensaios de neutralização apresentados). Numa realização não limitante, a capacidade de uma composição de ligação para neutralizar ou antagonizar a actividade de TGF Beta 1 é avaliada através da utilização do ensaio como descrito num Exemplo aqui apresentado.

A **actividade de neutralização** de uma composição de ligação, como seja, por exemplo, uma realização de anticorpo pode ser testada por um método aceite na área. Num exemplo não limitante, o ensaio é realizado adaptando-se ou modificando-se o ensaio de TGF de Randall *et al.* (1993) J. Immunol. Methods 164, 61-67. Este ensaio baseia-se na capacidade de TGF Beta 1 e TGF Beta 2 para inibirem a proliferação induzida por interleucina-5 (IL-5) da linha celular de eritroleucemia TF1 e a capacidade de reverter a inibição de TGF Beta com composições de ligação específica a TGF Beta. O ensaio está descrito como sendo rápido, reprodutível e com uma sensibilidade superior a 500 fg/ml de TGF-Beta 1 e 5-10 pg/ml de TGF-beta 2. O ensaio é igualmente descrito como sendo 100-1000 vezes menos sensível a outras moléculas inibidoras tais como interferão beta, interferão gama e TNF-alfa. O ensaio está igualmente descrito como sendo capaz de ser tornado específico para TGF-Beta 1 ou TGF-Beta 2 através da inclusão de anticorpos neutralizantes específicos para TGF-beta 1 ou TGF-beta 2 e de reconhecer todas as espécies moleculares recombinantes disponíveis destas moléculas, assim como as proteínas naturais produzidas a partir de plaquetas humanas e bovinas e de detectar TGF-beta em amostras de soro.

Outros ensaios, aqui descritos ou conhecidos na área, estão também incluídos. Por exemplo, o modelo de rato anti-Thy1.1 é um modelo bem estabelecido de glomerulonefrite mesangioproliferativa (ver e.g., Morita *et*

al., 1998 *Am. J. Kidney Dis.* 31:559-73; Bagchus, *et al.*, 1986 *Lab. Invest.* 55:680-7 e Yamamoto & Wilson 1987 *Kidney Int.* 32:514-25) no qual a injeção de um anticorpo dirigido contra o antígeno Thy localizado na superfície de células mesangiais induz mesangiólise seguido de uma fase de proliferação compensatória das células mesangiais resultando em níveis elevados de proteína na urina (proteinúria). O modelo de nefrite anti-Thy1.1 assemelha-se em muitos aspectos à nefrite por IgA humana ou a púrpura de Henoch-Schnlein (O'Donoghue, *et al.*, 1991 *J. Clin. Invest.* 88:1522-30) e foi usado para testar abordagens potencialmente terapêuticas de doença renal através da determinação da capacidade de composições a testar para efectuar decréscimos de proteinúria relacionados com a dose (ver, *e.g.*, Burg *et al.*, 1997 *Lab. Invest.* 76:505-16; Johnson *et al.*, 1995 *kidney Int.* 47:62-9). Numa realização preferida, uma composição de ligação do invento baixa a proteinúria neste modelo em 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% ou 80% ou mais. Estão ainda incluídas realizações tendo uma gama de proteinúria diminuída (neste modelo) entre dois dos valores indicados, gama essa que pode ou não incluir ambos os valores numéricos terminais (*e.g.*, uma gama >12% e ≤42%).

Ainda, pode-se adoptar o ensaio do modelo de ratinho diabético db/db de Sharma (ver, *e.g.*, 2000 PNAS 97:8015-20), demonstrando que a inibição crónica das acções biológicas de TGF-beta no rim previne eficazmente a falência renal resultante de diabetes u.c. ou pode-se adoptar o modelo de ratinho diabético Sharma STZ(1996 Diabetes 45, 522-30) para testar a capacidade de uma composição de ligação para melhorar ou prevenir nefropatia diabética. Ainda, Ueberham *et al.*, 2003 Hepatology 37(5):1067-78, descreve um sistema de expressão de genes regulado por tetraciclina num modelo de ratinho duplamente transgénico de fibrose hepática em que a expressão de TGF-Beta 1 é regulada pela adição ou remoção de hidrocloreto de doxiciclina à água de beber, permitindo assim alterar à vontade a expressão de TGF-Beta 1 de forma positiva ou negativa. O aumento da expressão de TGF-Beta 1 no fígado de tais animais conduz a estados de doença fibróticos que são reversíveis desligando a expressão de TGF-Beta 1 - mesmo após a massa hepática ter sido reduzida em 59%. A utilização deste modelo permite a avaliação dos efeitos das composições de ligação do invento na inibição das funções biológicas de TGF-Beta 1 através da comparação de uma composição de ligação do invento com os efeitos de hidrocloreto de doxiciclina desligando a expressão de TGF-Beta 1. Numa realização particular usando o ensaio de proliferação de células HT-2 (como aqui descrito) os requerentes preferencialmente incluem realizações de composições de ligação com um $IC_{50} \geq$ de pelo menos uma melhoria de: 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105, 125, 150, 175,

200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425 ou 450 vezes comparativamente com um valor de IC_{50} obtido usando uma composição de ligação semelhante, por exemplo, como seja o mAb2471 (descrito na Publicação Internacional N° WO2005/010049) nas mesmas condições do ensaio ou em condições semelhantes. Estão ainda abrangidas realizações tendo uma gama de melhoria de IC_{50} (como definido atrás) de dois desses valores que podem ou não incluir ambos os pontos terminais (e.g., uma melhoria de IC_{50} na gama de >80 e ≤ 100 vezes mais, e.g., mAb2471).

Anticorpos

Composições de ligação de anticorpos do invento incluem, e.g., sem limites, anticorpos policlonais, monoclonais, multi-específicos, humanos, humanizados ou quiméricos, anticorpos de cadeia simples, fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')$, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, e.g., anticorpos anti-Id contra anticorpos do invento) e um fragmento de ligação ao epítipo de qualquer um dos referidos atrás.

O termo "**anticorpo**" como aqui usado, refere-se a composições de imunoglobulina, e.g., uma molécula da composição de ligação que possui um local de ligação que, especificamente e/ou selectivamente, se liga a um antigénio. Uma composição de imunoglobulina do invento pode ser de qualquer tipo (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY),

classe (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgGA2) ou uma subclasse de uma molécula de imunoglobulina. De preferência, um anticorpo é um fragmento de anticorpo humano de ligação ao antígeno do invento, como seja, e.g., sem limitações, Fab, Fab' e F(ab')₂, Fc, Fvs de cadeia simples (scFv), anticorpos de cadeia simples, Fvs ligados a dissulfureto (sdFv) e fragmentos compreendendo um domínio VL ou VH. Fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno, podem compreender as regiões variáveis sozinhas ou em combinação com a totalidade ou uma porção do seguinte: uma região de charneira, um domínio CH1, CH2 ou CH3 ou combinações dos mesmos. Estão também incluídos no invento, e.g., sem limites, um fragmento de ligação a antígenos que também pode compreender qualquer combinação de regiões variáveis com uma região de charneira, e.g., tais com um domínio CH1, CH2 ou CH3 ou combinações dos mesmos. Um anticorpo do invento pode ser de qualquer origem animal incluindo aves e mamíferos. De preferência, os anticorpos são humanos, de primatas, murinos (e.g., ratinho e rato), burro, coelho, cabra, cobaio, camelo, cavalo ou galinha.

Como aqui usado, a frase "**anticorpos humanos**" inclui, e.g., sem limites, anticorpos tendo uma sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana incluindo, e.g., sem limites, um anticorpo isolado a partir de uma biblioteca de imunoglobulinas humanas (tais como, e.g., biblioteca de linha germinal humana) ou a partir de um animal transgênico para uma ou mais imunoglobulinas

humanas, como descrito aqui ou como ensinado na patente U.S. N° 5939598.

Uma composição de ligação pode ser mono-específica, bispecífica, trispecífica ou ter mais multispecificidade. Os anticorpos multispecíficos podem ser específicos para diferentes epitopos de uma proteína alvo, polipéptido (ou fragmento do mesmo) ou podem ser específicos para um TGF-beta 1, assim como para um epitopo heterólogo, como seja uma isoforma de TGF Beta heteróloga ou material do suporte sólido (ver, *e.g.* WO2093/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, *et al.*, (1991) J. Immunol. 147:60-69; Patentes US Nos 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; ou 5601819; ou Kostelny, *et al.*, (1992) J. Immunol.148:1547-1553.

Uma composição de ligação pode ser descrita ou especificada em termos de um epitopo ou porção de uma proteína TGF Beta 1 (ou fragmento da mesma) que reconhece ou selectivamente e/ou especificamente se liga. Um epitopo ou porções do polipéptido pode ser especificado como aqui descrito, *e.g.*, pelas posições N-terminais e C-terminais, pelo tamanho em resíduos de aminoácidos contíguos ou como descrito na Tabela e/ou Figura juntas, ou como aqui descrito. Ainda, um anticorpo que se liga especificamente a um epitopo, polipéptido, proteína ou fragmento de um polipéptido ou proteína, pode também ser especificamente excluído deste invento. Por exemplo, os requerentes reservam o direito de ressaltar qualquer anticorpo que se

ligue especificamente a um epitopo, polipéptido, proteína ou fragmento de um polipéptido ou proteína. Assim, o invento pode incluir um primeiro anticorpo (ou outro) que se liga especificamente a um polipéptido ou proteína ou fragmento da mesma e, ao mesmo tempo, pode excluir um segundo anticorpo (ou outro) que possa também selectivamente ligar-se à mesma proteína ou polipéptido ou fragmento do mesmo, e.g., através da ligação a um epitopo diferente. Numa realização preferida, os requerentes ressalvam uma composição de ligação que especificamente e/ou selectivamente se liga à isoforma de TGF Beta 1 relativamente a TGF Beta 2 e/ou TGF Beta 3 e que neutraliza TGF Beta 1, compreendendo pelo menos um local de ligação compreendendo pelo menos: quatro aminoácidos contíguos de QQWNGNPPA[SEQ ID NO:126]; pelo menos seis aminoácidos contíguos de QQWDSNPPA [SEQ ID NO: 127]; pelo menos cinco aminoácidos contíguos de YIYPYNGDTGYNQKFKS [SEQ ID NO: 128] (em que um dos referidos pelo menos cinco aminoácidos contíguos é D); ou pelo menos cinco aminoácidos contíguos de GYTFTDYTMH [SEQ ID NO:129].

Os anticorpos do invento podem também ser descritos ou especificados em termos da sua reactividade cruzada. Os anticorpos que não se ligam a qualquer outro análogo, ortólogo, paralogo ou homólogo de uma proteína ou polipéptido alvo (ou fragmento do mesmo) estão incluídos.

Uma composição de ligação pode também ser caracterizada ou especificada em termos da sua afinidade de

ligação para uma proteína ou polipéptido (fragmento do mesmo) ou epitopo. Numa outra realização, uma afinidade de ligação preferida de uma composição de ligação, e.g., um anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo, inclui, e.g. uma afinidade de ligação (usando um ensaio aqui descrito) que demonstra uma constante de dissociação ou K_d inferior a (ou numa gama entre dois números definidos abaixo, gama essa que pode ou não incluir um ou ambos os pontos terminais): $10^{-11}M$, $5 \times 10^{-12}M$, $4,9 \times 10^{-12}M$, $4,8 \times 10^{-12}M$, $4,7 \times 10^{-12}M$, $4,6 \times 10^{-12}M$, $4,5 \times 10^{-12}M$, $4,4 \times 10^{-12}M$, $4,3 \times 10^{-12}M$, $4,2 \times 10^{-12}M$, $4,1 \times 10^{-12}M$, $4,0 \times 10^{-12}M$, $3,9 \times 10^{-12}M$, $3,8 \times 10^{-12}M$, $3,7 \times 10^{-12}M$, $3,6 \times 10^{-12}M$, $3,5 \times 10^{-12}M$, $3,4 \times 10^{-12}M$, $3,3 \times 10^{-12}M$, $3,2 \times 10^{-12}M$, $3,1 \times 10^{-12}M$, $3,0 \times 10^{-12}M$, $2,9 \times 10^{-12}M$, $2,8 \times 10^{-12}M$, $2,7 \times 10^{-12}M$, $2,6 \times 10^{-12}M$, $2,5 \times 10^{-12}M$, $2,4 \times 10^{-12}M$, $2,3 \times 10^{-12}M$, $2,2 \times 10^{-12}M$, $2,1 \times 10^{-12}M$, $2,0 \times 10^{-12}M$, $1,9 \times 10^{-12}M$, $1,8 \times 10^{-12}M$, $1,7 \times 10^{-12}M$, $1,6 \times 10^{-12}M$, $1,5 \times 10^{-12}M$, $1,4 \times 10^{-12}M$, $1,3 \times 10^{-12}M$, $1,2 \times 10^{-12}M$, $1,1 \times 10^{-12}M$, $1,0 \times 10^{-12}M$, $0,9 \times 10^{-12}M$, $0,8 \times 10^{-12}M$, $0,7 \times 10^{-12}M$, $0,6 \times 10^{-12}M$, $0,5 \times 10^{-12}M$, $0,4 \times 10^{-12}M$, $0,3 \times 10^{-12}M$, $0,2 \times 10^{-12}M$, $0,1 \times 10^{-12}M$, $10^{-12}M$, $5 \times 10^{-13}M$, $10^{-13}M$, $5 \times 10^{-14}M$, $10^{-14}M$, $5 \times 10^{-15}M$ ou $10^{-15}M$.

Os anticorpos do invento podem actuar como antagonistas de TGF Beta 1 (ou de um fragmento do mesmo). Por exemplo, um anticorpo ou composição de ligação do invento pode destruir, e.g., uma interacção, parcialmente ou completamente, de TGF Beta 1 com um receptor/ligando cognato. De preferência, os anticorpos do invento ligam-se

a um epitopo antigénico de TGF Beta 1 ou a uma porção do mesmo.

Igualmente abrangidos pelo invento, estão anticorpos que se ligam a um ligando e evitam que este se ligue a um receptor (*e.g.*, por impedimento espacial). De forma semelhante, são abrangidos anticorpos de ligação a ligandos que inibem a activação de receptores sem inibir a ligação ao receptor.

Os anticorpos do invento podem ser usados, *e.g.*, sem limites, para purificar, detectar ou atingir um TGF Beta 1 (ou fragmento do mesmo) para, *e.g.*, métodos de diagnóstico ou terapêuticos *in vitro* e/ou *in vivo*. Por exemplo, os anticorpos têm utilidade em imunoensaios para qualitativamente e/ou quantitativamente medir níveis de TGF-Beta 1 (ou fragmento do mesmo) do invento numa amostra biológica (ver *e.g.*, Harlow & Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)).

Uma composição de ligação pode ser usada sozinha ou em combinação com outras composições. Ainda, uma composição de ligação, como seja um anticorpo, pode ser fundida, por via recombinante, a um polipéptido heterólogo no extremo N ou C, ou conjugado quimicamente (incluindo conjugações covalentes e não covalentes) a um polipéptido ou a outras composições. Por exemplo, os anticorpos do invento podem ser fundidos ou conjugados por via

recombinante a moléculas úteis em ensaios de detecção e a moléculas efectoras, tais como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionuclidos ou toxinas (ver e.g., WO 92/08495; WO 89/12624; Patente U.S. N° 5314995; e EP 396387).

Uma composição de ligação inclui, e.g., derivados que são modificados, e.g., pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula, e.g., a um anticorpo de forma que a ligação covalente não iniba o anticorpo de gerar uma resposta anti-idiotípica. Por exemplo, um derivado de anticorpo inclui sem limites anticorpos modificados, e.g., através de glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização com grupos protectores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou a outra proteína, etc. Qualquer uma de várias modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, e.g., mas não estando limitado, a clivagem química específica, acetilação, formulação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Ainda, um derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos. Uma composição de ligação pode ser gerada por qualquer um dos métodos adequados conhecidos na área. Por exemplo, podem ser preparados anticorpos monoclonais usando qualquer uma de várias técnicas conhecidas na área tais como, e.g., Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Halow & Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); Breitling & Dubel 1999 *Recombinant Antibodies* (John Wiley & Sons, New York); H.

Zola, Monoclonal Antibodies (Garland Press); e James W. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Academic Press).

O termo "**anticorpo monoclonal**" como aqui usado não está limitado a anticorpos produzidos por uma técnica particular, (e.g., tecnologia de hibridomas). Métodos para a produção e rastreamento de anticorpos específicos usando tecnologia de hibridomas são usados de rotina e conhecidos na área. O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo derivado de um único clone, incluindo qualquer clone eucariótico, procariótico ou fágico e não o método pelo qual é produzido.

Fragmentos de anticorpo que reconhecem epitopos específicos podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, fragmentos Fab e $F(ab')_2$ do invento podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, usando enzimas tais como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos $F(ab')_2$). Os fragmentos $F(ab')_2$ possuem a região variável, a região constante da cadeia leve e o domínio CH1 da cadeia leve. Por exemplo, uma composição de ligação pode também ser gerada usando vários métodos de apresentação fágica conhecidos na área em que os domínios de anticorpos funcionais são apresentados na superfície de partículas fágicas, as quais são portadoras de uma sequência polinucleotídica.

Numa realização particular, um método de apresentação fágica é usado para apresentar domínios de ligação a antígeno expressos a partir de um reportório ou biblioteca de anticorpos combinatórios (e.g., humano ou murino). Os fagos que expressam um domínio de ligação a antígeno que se liga a um antígeno de interesse podem ser seleccionados ou identificados com antígeno, e.g., usando antígeno marcado ou antígeno ligado ou capturado numa superfície sólida ou esfera. Após selecção dos fagos, as regiões codificadoras de anticorpos dos fagos foram isoladas e usadas para gerar anticorpos completos, incluindo anticorpos humanos ou quaisquer outros fragmentos de ligação a antígeno pretendidos e expressos em qualquer hospedeiro pretendido, incluindo células de mamífero, células de insecto, células vegetais, leveduras e bactérias, e.g., como aqui descrito ou na literatura.

As técnicas para produzir por via recombinante fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂ podem também ser empregues usando métodos conhecidos tais como, e.g., WO 92/122324; Mullinax, et al., BioTechniques 1992 12(6):864-9; e Sawai et al., 1995 AJRI 34:26-34; e Better et al., 1988 Science 240:1041-3. Exemplos de produção de Fvs de cadeia simples e de anticorpos incluem, e.g., Patentes U.S. 4946778 e 5258498; Huston et al., 1991 Methods in Enzymology 203:46-88; Shu et al., 1993 PNAS USA 90:7995-9; e Skerra et al., 1988 Science 240:1038-40. Para algumas utilizações, incluindo a utilização *in vivo* de anticorpos em seres humanos e ensaios de detecção *in vitro*, pode ser preferível

usar anticorpos humanizados ou humanos produzidos por técnicas conhecidas.

Anticorpos humanizados são aqui composições de ligação que se ligam a um antigénio pretendido tendo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) como aqui descrito inseridas dentro de uma região estrutural, os quais têm menos probabilidade de criar uma reacção de imunogenicidade prejudicial quando da introdução *in vivo* num sistema de hospedeiro humano (e.g., após administração parentérica). Frequentemente, as regiões dadoras de CDR são apropriadamente inseridas dentro das regiões estruturais humanas para melhorar a ligação a antigénio e/ou reduzir a imunogenicidade. Regiões estruturais úteis podem ser identificadas usando métodos conhecidos, e.g., por (1) modulação das interacções de uma CDR e resíduos estruturais para identificar resíduos estruturais importantes para a ligação ao antigénio; (2) por comparação de sequências para identificar resíduos estruturais invulgares em posições particulares (ver, e.g., Patente U.S. N° 5585089, Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988); ou (3) empiricamente.

Regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da região variável da cadeia pesada e leve de realizações particulares de composições de ligação de anticorpos monoclonais do invento estão apresentadas abaixo na Tabela 1 (a&b). As regiões CDR estão indicadas usando o código convencional de uma só letra para aminoácidos e numeração convencional de CDR, (*i.e.*, com o valor numérico crescente

de uma CDR correspondendo à sua maior proximidade ao domínio constante de uma estrutura de cadeia pesada ou leve de IgG típica; e.g., VH CDR3 está mais próximo do domínio CH1 do que VH CDR1).

Realizações de CDRs específicas são representadas genericamente usando fórmulas de aminoácidos para descrever um género de CDRs (novamente, usando o código convencional de uma só letra com os resíduos de aminoácidos substituíveis indicados pela letra "X" e a substituição dos seus resíduos dentro de uma CDR particular indicada por um índice numérico cujo valor aumenta do mais baixo (mais perto do extremo amina) para o mais alto (mais perto do extremo carboxilo) na CDR (e.g., X_1 em VHCDR2 é o resíduo mais perto do extremo amina da CDR, enquanto o resíduo substituível mais perto do extremo carbonilo é X_6). Usando estas fórmulas gerais, os familiarizados com matéria podem determinar todas as realizações de CDR possíveis em cada posição designada numa realização do domínio variável da cadeia pesada ou leve (V_L ou V_H) abrangidas pelo invento. Qualquer exemplo particular de uma possível sequência de aminoácidos é determinada apenas gerando todas as substituições possíveis em cada resíduo X particular dentro da fórmula CDR particular usando o código de aminoácidos. Todas essas realizações estão aqui incluídas)).

A informação nas tabelas que se seguem é proporcionada apenas a título informativo e não faz parte do invento.

Tabela 1a Fórmula das CDRs da cadeia pesada das composições de ligação

CDRs da cadeia pesada		
CDR1	CDR2	CDR3
GYX ₁ FX ₂ DYNX ₃ X ₄ * [SEQ ID NO: 2]	X ₁ X ₂ YPYDGX ₃ TGX ₄ NX ₅ KX ₆ KS ** [SEQ ID NO: 3]	GYRX ₁ X ₂ X ₃ Y *** [SEQ ID NO: 4]

- *Para VHCDR1: X₁ é T ou D; X₂ é T, E ou F; X₃ é M, I, L ou V; e X₄ é H, V ou A.

- **ParaVHCDR2: X₁ é Y, Q ou S; X₂ é I ou V; X₃ é D ou E; X₄ é Y, T, H ou L; X₅ é Q, K, P ou S; e X₆ é F ou Y.

- ***Para VHCDR3: X₁ é W ou A; X₂ é F ou L; e X₃ é A, E ou Y.

Tabela 1b Fórmula das CDRs da cadeia leve das composições de ligação

CDRs da cadeia leve		
CDR1	CDR2	CDR3
X ₁ AX ₂ X ₃ X ₄ VX ₅ YMH * [SEQ ID NO: 5]	ATSNX ₁ AX ₂ ** [SEQ ID NO: 6]	X ₁ QWDX ₂ X ₃ X ₄ PA *** [SEQ ID NO: 7]

- *Para VLCDR1: X₁ é R, Y, E ou Q; X₂ é S ou T; X₃ é S, V ou A; X₄ é S ou L; X₅ é S, P, L ou Y.

- **Para VLCDR2: X₁ é L, N ou P; e X₂ é S, K, Y, L, M, F, E, Q, R ou H.

-***Para VLCDR3: X₁ é Q ou S; X₂ é L, D ou P; X₃ é N ou R; e X₄ é P, F, Y ou R.

Ainda, são abrangidas composições de ligação de anticorpos usando CDRs aqui incluídas que estão inseridas (na orientação adequada) ou são transportadas pelas regiões estruturais de anticorpos humanos para permitir que a composição de ligação resultante se ligue, especificamente e/ou selectivamente, a TGF Beta 1 maduro relativamente a TGF Beta 2 e/ou TGF Beta 3 maduro e neutralize TGF Beta 1 maduro. Técnicas conhecidas na área podem ser usadas para colocar CDRs particulares dentro de regiões estruturais adequados.

Numa realização preferida, a região estrutural HCVR FR1 compreende QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS [SEQ ID NO:8]; a região estrutural HCVR FR2 compreende WVRQAPGQGLEWMG [SEQ ID NO:9]; a região estrutural HCVR FR3 compreende RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR [SEQ ID NO:10]; e a região estrutural HCVR FR4 WGQGTLLVTVSS [SEQ ID NO:11]. Numa outra realização preferida, a região estrutural LCVR FR1 compreende DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [SEQ ID NO:12]; a região estrutural LCVR FR2 compreende a sequência seleccionada de: [SEQ ID NO:13, 14 & 18], a região estrutural LCVR3 FR3 compreende GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC [SEQ ID NO:37]; e a região estrutural LCVR FR4 compreende FGQGTKLEIK [SEQ ID NO: 38]. São igualmente divulgadas regiões estruturais que podem conter alterações, deleções, adições, substituições ou quaisquer combinações das mesmas. Ainda, as regiões estruturais em que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 aminoácidos são substituídos, eliminados ou adicionados em qualquer combinação são igualmente descritas.

Numa realização, uma região constante da cadeia pesada preferida para usar em CDRs enxertadas da composição de ligação de anticorpo do invento inclui, por exemplo, uma região constante de IgG. Numa realização mais preferida, a região constante de IgG é uma região constante de IgG1 ou uma região constante IgG4 como se mostra abaixo:

IgG1 [SEQ ID NO: 39]:

```
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG; or
```

IgG4 [SEQ ID NO: 40]

```
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
```

Uma sequência da região constante da cadeia leve preferida do invento é a região constante da cadeia capa mostrada abaixo:

```
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO: 41]
```

Numa outra realização preferida, as composições de ligação de anticorpo possuem a região constante da cadeia pesada de IgG1 ou a região constante da cadeia pesada de IgG4 e a região constante da cadeia leve capa.

A realização que se segue é proporcionada apenas a título informativo e não faz parte do invento. Usando a informação aqui apresentada, os familiarizados com a matéria poderão criar uma realização de mAb, por exemplo, como seja N° 46P-L1-6, o qual terá uma cadeia leve compreendendo:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCEASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWDLNPPAFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO: 130] where:

em que:

a região estrutural LCVR FR1 = DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITC;

a VL CDR1 = EASSSVSYMH da fórmula $X_1AX_2X_3X_4VX_5YMH$, em que X_1 é R, Y, E ou Q; X_2 é S ou T; X_3 é S, V ou A; X_4 é S ou L; e X_5 é S, P, L ou Y;

a região estrutural LCVR FR2 = WYQQKPGKAPKAPKPLIY;

a VL CDR2 = ATSNLAS da fórmula $ATSNX_1AX_2$, em que X_1 é L, N ou P; e X_2 é S, K, Y, L, M, F, E, Q, R ou H;

a região estrutural LCVR FR3 = GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC;

a VL CDR3 = QQWDLNPPA da fórmula $X_1QWDX_2X_3X_4PA$, em que X_1 é Q ou S; X_2 é L, D ou P; X_3 é N ou R; e X_4 é P, F, Y ou R;

a região estrutural LCVR FR4 = FGQGTKLEIK; e

a região constante da cadeia leve =

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

e a cadeia pesada compreendendo:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPYDGD
 TGYNQKFKSRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYRWFAYWGQGLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSLG [SEQ ID NO: 131] where:

em que:

a região estrutural HCVR FR1 = QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS;

a VH CDR1 = GYTFTDYNMH da fórmula $GYX_1FX_2DYNX_3X_4$; X_1 é T ou D; X_2 é T, E ou F; X_3 é M, I, L ou V; e X_4 é H, V ou A;

a região estrutural HCVR FR2 = WVRQAPGQGLEWMG;

a VH CDR2 = YIYPYDGD TGYNQKFKS da fórmula

$X_1X_2YPYDGX_3TGX_4NX_5KX_6KS$; X_1 é Y, Q ou S; X_2 é I ou V; X_3 é D ou E; X_4 é Y, T, H ou L; X_5 é Q, K, P ou S; e X_6 é F ou Y;

a região estrutural HCVR FR3 = RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR;

a VH CDR3 = GYRWFAY da fórmula $GYRX_1X_2X_3Y$; em que X_1 é W ou A; X_2 é F ou L; X_3 é A, E ou Y,

a região estrutural HCVR FR4 = WGQGLVTVSS; e

a região constante da cadeia pesada =

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
 VMHEALHNYTQKSLSLSLG.

Polinucleótidos codificadores de anticorpos

Moléculas de ácido nucleico compreendendo sequências de polinucleótidos que codificam uma composição de ligação (ou fragmento da mesma) ou sequência

polipeptídica do invento podem ser obtidas e a sequência nucleotídica dos polinucleótidos determinada por qualquer método conhecido na área, por exemplo, se a sequência polipeptídica (e.g., de um anticorpo ou fragmento do mesmo) for conhecida, um polinucleótido codificador do polipéptido pode ser determinado simplesmente usando a degenerescência do código genético em qualquer algoritmo de computador e a informação sobre a sequência resultante pode ser usada para montar, por exemplo, oligonucleótidos obtidos por síntese química (e.g., como descrito em Kutmeier, *et al.*, (1994) *BioTechniques* 17:242), que, descrevendo resumidamente, envolve a síntese de oligonucleótidos sobreponíveis contendo porções da sequência codificadora da sequência polipeptídica, emparelhamento e ligação daqueles oligonucleótidos, depois amplificação dos oligonucleótidos ligados usando uma reação em cadeia da polimerase.

Como alternativa, um polinucleótido codificador de uma sequência polipeptídica do invento pode ser gerado a partir de ácido nucleico de qualquer fonte adequada. Se um clone contendo uma molécula de ácido nucleico codificadora de um anticorpo particular não existir mas, no entanto, a sequência da molécula de anticorpo for conhecida, então um ácido nucleico codificador da imunoglobulina pode ser obtido por síntese química ou a partir de uma fonte adequada. Por exemplo, a fonte pode ser uma biblioteca de cDNA de anticorpos ou uma biblioteca de cDNA gerada a partir de RNA poli A+ derivado de qualquer tecido ou célula que expresse o anticorpo com interesse, como seja, e.g.,

células de hibridoma seleccionadas para expressarem um anticorpo do invento, através da amplificação por PCR usando sequências iniciadoras sintéticas hibridáveis com os extremos 3' e 5' de uma sequência polinucleotídica de interesse ou através da clonagem usando uma sonda oligonucleotídica específica para a sequência do gene particular a identificar, e.g., um clone de cDNA de uma biblioteca de cDNA que codifica o anticorpo, pode ser gerada uma molécula de ácido nucleico do anticorpo.

Os ácidos nucleicos amplificados podem ser clonados em vectores de clonagem replicáveis usando qualquer método conhecido na área. Uma vez determinada a sequência de nucleótidos e a correspondente sequência de aminoácidos, a sequência nucleotídica do anticorpo pode ser manipulada usando qualquer método conhecido na área, e.g., técnicas de DNA recombinante, mutagénese dirigida, PCR, etc. para gerar anticorpos tendo uma sequência de aminoácidos diferente para criar substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos (ver e.g., Sambrook, *et al.*, e Ausubel, *et al.*, eds., cur. Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Numa realização específica, a sequência de aminoácidos dos domínios variáveis da cadeia pesada e/ou leve pode ser analisada para identificar as sequências das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) por métodos conhecidos, e.g., através da comparação de sequências de aminoácidos conhecidas de outras regiões

variáveis da cadeia pesada e leve para determinar a hipervariabilidade da sequência. Usando técnicas de DNA recombinante de rotina, uma ou mais CDRs aqui descritas podem ser inseridas dentro de quaisquer regiões estruturais adequadas, e.g., nas regiões estruturais humanas para reduzir a imunogenicidade. As regiões estruturais podem ser naturais ou regiões estruturais de consenso (ou como aqui descrito) e são preferencialmente regiões estruturais humanas (para uma listagem de regiões estruturais humanas ver, e.g., Chothia, et al., 1998 J. Mol. Biol. 278:457-79). Falando genericamente, para identificar resíduos dentro das regiões estruturais humanas que possam influenciar a integridade do local de ligação ao antígeno e portanto a ligação ao antígeno, tanto sequências dadoras como sequências aceitadoras humanas selecionadas podem ser alinhadas com várias matrizes de sequências derivadas de reportórios de anticorpos. "Resíduos invariantes" (Kabat et Al., 1991) e "resíduos chave" (Chothia et al., 1989) são identificados e as classificações da classe canônica das ansas de ligação ao antígeno dadoras L1-L3, H1 e H2, respectivamente, são determinadas por rastreamento da sequência contra matrizes de sequências (Martin & Thornton, 1996 Mol. Biol. 263:800-15 em <http://www.bioinf.org.uk/>). Ainda, os resíduos na interface VH/VL (Chothia et al., 1985) e os resíduos conhecidos como estando estruturalmente conservados nos locais centrais (Chothia et al., 1998) foram comparados com os correspondentes resíduos dadores e aceitadores. Resíduos estruturais dadores e aceitadores não condizentes nestes locais foram analisados com base em

informação de outros anticorpos de estrutura conhecida obtida no Protein Data Bank (Berman, et al., 2000 Nucl. Acids Res. 28(1):235-42). A selecção de regiões estruturais humanas para usar como matrizes para a humanização das regiões V estranhas pode definir decisões subsequentes relativamente a quais os resíduos humanizar. A escolha de matrizes homólogas dos anticorpos com estrutura cristalina conhecida de sequências germinais, não germinais ou de consenso derivadas das bases de dados disponíveis são opções (para uma revisão, ver Routledge et al. (Routledge et al., 1993 em Protein Engineering of Antibody Molecules for prophylactic and Therapeutic Applications in Man (Clark, M., ed) pp. 14-44, Academic Titles, Nottingham, UK; e B Lo, 2004 Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press)). Uma outra estratégia para humanizar anticorpos é escolher a sequência germinal humana mais próxima (Tomlinson et al., 1992) como a região estrutural para receber as CDRs dadoras. Esta abordagem germinal baseia-se no mesmo raciocínio lógico da estratégia de melhor ajuste, mas apenas as sequências germinais são pesquisadas nas bases de dados (ver, e.g., V BASE, a qual é um directório compreensivo de sequências da região variável germinal humana compiladas a partir de cerca de um milhar de sequências publicadas, incluindo as libertadas das bibliotecas de dados Genbank e EMBL. A base de dados V BASE foi desenvolvida ao longo de vários anos no MRC Center for protein Engineering (Cambridge, UK) como uma extensão do trabalho de sequenciação e mapeamento de genes de anticorpos humanos e como uma ferramenta de fácil utilização para a sua análise). O método da região

estrutural germinal é muito útil devido à sequência germinal humana não apresentar hipermutações somáticas que sejam potencialmente imunogénicas. As CDRs podem igualmente ser enxertadas ou inseridas nas regiões estruturais humanas usando uma estratégia de sequência germinal humana de consenso, em que um dos subgrupos humanos é usado como a região estrutural (ver, e.g., Presta et al., 1993 J. Immunol. 151:2623-32; Couto et al., 1994 Hybridoma, 13:215-9; Couto et al., 1995 Cancer Res. (Suppl.), 55, 5973s-7s; Werther et al., 1996 J. Immunol., 157:4986-95; O'Connor et al., 1998 Protein Engng. 11:321-8).

De preferência, o polinucleótido gerado pela combinação das regiões estruturais e CDRs codifica um anticorpo (ou fragmento do mesmo) que especificamente e/ou selectivamente se liga a TGF Beta 1 (ou epitopo do mesmo). De preferência, como aqui discutido, pode ser feita uma ou mais substituições de aminoácidos dentro das regiões estruturais para melhorar a ligação do anticorpo ao seu antígeno.

Ainda, tais métodos podem ser usados para fazer substituições ou deleções de aminoácidos de um ou mais resíduos de cisteína das regiões variáveis que participem numa ligação dissulfureto intracadeia para gerar moléculas de anticorpo sem uma ou mais ligações dissulfureto intracadeia. Outras alterações do polinucleótido estão abrangidas pelo invento e dentro das capacidades dos que trabalham na área, como seja um biólogo molecular.

Como alternativa, podem ser adaptadas técnicas para produzir anticorpos de cadeia simples (ver, e.g., patente U.S. N° 4946778; Bird Science 242:423-42 (1988); Huston et al., PNAS 85:5879-5883 (1988); e Ward et al., Nature 334:544-54 (1989)). Os anticorpos de cadeia simples são formados através da ligação de fragmentos da cadeia pesada e da cadeia leve da região Fv através de uma ponte de aminoácidos, resultando num polipéptido de cadeia simples. Também podem ser usadas técnicas para a montagem de fragmentos Fv funcionais em *E. coli* (Skerra, et al., (1988) Science 242:1038-1041).

Fragmentos polipeptídicos

O invento também abrange fragmentos de uma composição de ligação. Um "fragmento ou segmento polipeptídico" engloba uma sequência de aminoácidos que é uma porção de uma sequência aqui descrita ou uma porção de uma sequência polipeptídica de uma SEQ ID NO:. Fragmentos ou segmentos de proteínas e/ou polipéptidos podem "existir por si sós" ou podem compreender parte de um polipéptido ou proteína maior, do qual o fragmento ou segmento forma uma porção ou região, e.g., uma região contínua simples de uma SEQ ID NO: aqui associada numa proteína de fusão.

De preferência, um segmento polipeptídico pode ter um comprimento de aminoácidos contíguos de pelo menos cerca de: 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58,

60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 110, 120, 130, 140 ou 150 aminoácidos contíguos de comprimento. Neste contexto "cerca de" inclui, e.g., as gamas ou valores especificamente aqui descritos e também inclui valores que diferem dos valores referidos em vários resíduos de aminoácidos (e.g., mais ou menos 5, mais ou menos 4, mais ou menos 3, mais ou menos 2 ou; mais ou menos 1 resíduos de aminoácidos) num ou em ambos os extremos do fragmento. Os polinucleótidos codificadores de tal fragmento polipeptídico estão igualmente abrangidos pelo invento.

Ainda, o invento inclui proteínas ou polipéptidos compreendendo uma pluralidade dos referidos segmentos ou fragmentos de aminoácidos, e.g., segmentos não sobreponíveis de um determinado tamanho. Tipicamente, uma pluralidade será pelo menos dois, mais geralmente pelo menos três e, de preferência, pelo menos: quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou mais. São referidos comprimentos mínimos de um segmento e comprimentos máximos de vários tamanhos são também considerados para qualquer pluralidade específica de segmentos, e.g., uma pluralidade de três segmentos *in toto* poderá ter um segmento de 7 aminoácidos contíguos e dois outros segmentos não sobreponíveis, cada um com um comprimento de 12.

São igualmente preferidos fragmentos ou segmentos polipeptídicos (e seus correspondentes fragmentos polinucleotídicos) que caracterizam os domínios estruturais

ou funcionais, tais como fragmentos, ou combinações dos mesmos, que compreendem e.g., regiões determinantes de complementaridade (CDRs tais como VL ou VH: CDR1, CDR2 ou CDR3), regiões variáveis (e.g., da cadeia pesada ou leve, VL ou VH), regiões estruturais (FH1, 2, 3 ou 4), regiões D ou J, domínios constantes (e.g., tais como CL, CH1, CH2 ou CH3), regiões de charneira, regiões de ligação ao receptor Fc gama, hélices alfa e regiões formadoras de hélices alfa, folhas beta e regiões formadoras de folhas beta, voltas e regiões formadoras de voltas, espirais e regiões formadoras de espirais, regiões hidrofílicas, regiões hidrofóbicas, regiões alfa anfipáticas, regiões beta anfipáticas, regiões flexíveis, regiões de ansa, domínios de pé e ansa, motivos beta-alfa-beta, feixes de hélices, barrils alfa/beta, barris beta ascendentes e descendentes, motivos "jelly roll" ou "Swiss roll", domínios transmembranares, regiões formadoras de superfícies, regiões de ligação a substratos, regiões transmembranares, adaptadores, regiões imunogénicas, regiões de epitopos e regiões de elevado índice antigénico. Ainda, polinucleótidos codificadores destes domínios estão igualmente incluídos.

Outros segmentos polipeptídicos preferidos são fragmentos biologicamente activos. Os fragmentos biologicamente activos são os que apresentam actividade semelhante, mas não necessariamente idênticos, a uma actividade de um polipéptido de composição de ligação (ou fragmento do mesmo) como seja, e.g., Fab, Fv, scFv ou F(ab)₂. Polinucleótidos codificadores destes fragmentos polipeptídicos estão também abrangidos pelo invento.

De preferência, os fragmentos polinucleotídicos codificam um polipéptido que demonstre uma actividade funcional. A frase "actividade funcional" engloba um segmento polipeptídico que pode ter uma ou mais actividades funcionais conhecidas. Tais actividades funcionais incluem, e.g., sem limites, actividade biológica, antigenicidade [capacidade para se ligar (ou competir com um polipéptido para ligação) a uma composição de ligação de anticorpo a um polipéptido do invento], imunogenicidade (capacidade para gerar anticorpos que se liguem a um polipéptido do invento), capacidade para formar multímeros com um polipéptido do invento e a capacidade para se ligar a um receptor ou ligando de um polipéptido aqui descrito.

A actividade funcional de um polipéptido (incluindo fragmentos, variantes, derivados e análogos dos mesmos) pode ser testada por vários métodos. Por exemplo, quando se testa a capacidade de ligação ou de competição com um polipéptido de tamanho completo do invento relativamente à ligação a um anticorpo de um polipéptido do invento, podem ser usados vários imunoensaios conhecidos na área, incluindo, e.g., sem limitação, sistemas de ensaio competitivos e não competitivos usando técnicas tais como radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunossorvente ligado a enzimas), "imunoensaios em sanduíche", ensaios imunoradiométricos, reacções de precipitação por difusão em gel, ensaios de imunodifusão, imunoensaios *in situ* (usando ouro coloidal, marcas enzimáticas ou radioisótopos, por

exemplo), transferências Western, reacções de precipitação, ensaios de aglutinação (e.g., ensaios de aglutinação em gel), ensaios de hemaglutinação, ensaios de fixação do complemento, ensaios de imunofluorescência, ensaios com proteína A e ensaios de imuno-electroforese, etc.).

Numa outra realização, a ligação de anticorpos é conseguida através da detecção de uma marca no anticorpo primário. Numa outra realização, o anticorpo primário é detectado através da detecção da ligação de um anticorpo secundário ou reagente para o anticorpo primário. Numa outra realização, o anticorpo secundário é marcado. São conhecidos muito meios na área para detecção da ligação num imunoensaio e estão dentro do âmbito do invento.

Numa outra realização, quando um ligando é identificado ou a capacidade de um fragmento, variante ou derivado polipeptídico do invento para multimerizar está a ser avaliada, a ligação pode ser testada, e.g., através da utilização da cromatografia em gel redutor e não redutor, cromatografia de afinidade para proteínas e afinidade em membranas (ver, de um modo geral, Phizicky *et al.* (1995) Microbiol. Ver. 59:94-123). Numa outra realização, os efeitos fisiológicos da ligação de um polipéptido aos seus substratos (transdução de sinal) podem ser testados com técnicas comuns. Ainda, os ensaios aqui descritos (ver, e.g., a secção dos "Exemplos" deste pedido) ou descritos na literatura podem de rotina ser aplicados para medir a capacidade de uma composição de ligação (os seus

fragmentos, variantes, derivados e análogos dos mesmos) para modular uma actividade biológica relacionada (*in vitro* ou *in vivo*) de TGF Beta 1.

Métodos de produção de anticorpos

Uma composição de ligação de anticorpo pode ser produzida por qualquer método conhecido na área, em particular por síntese química ou, preferencialmente, por técnicas de expressão recombinantes.

A expressão recombinante de uma composição de ligação ou fragmento, derivado ou análogo do mesmo (e.g., uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo do invento ou um anticorpo de cadeia simples do invento), requer a construção de um vector de expressão contendo uma sequência polinucleotídica que codifica o anticorpo. Uma vez obtida uma sequência polinucleotídica codificadora de uma molécula de anticorpo ou de uma cadeia pesada ou leve de anticorpo, ou porção do mesmo (de preferência contendo o domínio variável da cadeia pesada ou leve) do invento, o vector para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido por técnicas conhecidas da tecnologia de DNA recombinante.

Podem ser usados métodos conhecidos na área para construir vectores de expressão contendo sequências codificadoras da composição de ligação e sinais adequados de controlo da transcrição e tradução. Estes métodos incluem, e.g., sem limitações, técnicas *in vitro* de DNA

recombinante, técnicas de síntese química e recombinações genéticas *in vivo*. O invento, engloba assim vectores replicáveis compreendendo a sequência nucleotídica codificadora de um anticorpo do invento (ou fragmento do mesmo) ou uma sua cadeia pesada ou leve ou um domínio variável da cadeia pesada ou da cadeia leve, ou uma CDR operacionalmente ligada a um promotor. Tais vectores podem incluir, e.g., a sequência nucleotídica codificadora da região constante da molécula de anticorpo (ver e.g., WO86/05807; WO 89/01036; ou Patente U.S. Nº 5122464) e o domínio variável do anticorpo pode ser clonado em tal vector para expressão da totalidade da cadeia pesada ou leve ou qualquer porção da mesma.

Falando de um modo geral, um vector de expressão é transferido para uma célula hospedeira através de técnicas convencionais e as células transfectadas foram então cultivadas para produzir um anticorpo ou porção do mesmo. Assim, o invento também envolve, e.g., células hospedeiras contendo um polinucleótido codificador de um anticorpo do invento, ou de uma cadeia pesada ou leve do mesmo, ou de um anticorpo de cadeia simples do invento, operacionalmente ligado a um promotor heterólogo. Em realizações preferidas para a expressão de anticorpos de cadeia dupla, vectores codificadores das cadeias pesada e leve podem ser co-expressos numa célula hospedeira para expressão de toda a molécula de imunoglobulina, como aqui descrito ou conhecido na área.

Pode ser utilizada uma variedade de sistemas hospedeiro-vector de expressão para expressar moléculas de anticorpo do invento. Tais sistemas hospedeiro-vector de expressão representam veículos através dos quais qualquer sequência codificadora com interesse pode ser produzida e subsequentemente purificada. No entanto, quando transformadas ou transfectadas com uma sequência codificadora nucleotídica adequada, as células hospedeiras do sistema de expressão podem também representar uma molécula de anticorpo do invento *in situ*. Estas células incluem, e.g., sem limitação, microrganismos tais como bactérias (e.g., *E. coli*, *B. subtilis*) transformados com DNA de bacteriófago recombinante, DNA de plasmídeo ou vectores de expressão de DNA de cosmídeo contendo sequências codificadoras de anticorpo; leveduras (e.g., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas com vectores de expressão recombinantes de levedura contendo sequências codificadoras de anticorpos; sistemas de células de insecto infectadas com vectores de expressão virais recombinantes (e.g., baculovírus) contendo sequências codificadoras de anticorpos; sistemas de células vegetais infectadas com vectores de expressão virais recombinantes (e.g., vírus do mosaico da couve flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vectores de expressão plasmídicos recombinantes (e.g., plasmídeo Ti) contendo sequências codificadoras de anticorpos; ou sistemas de células de mamífero (e.g., células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) portadores de construções de expressão recombinantes contendo promotores derivados do genoma das células de mamífero

(e.g., promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (e.g., promotor tardio de adenovírus; o promotor 7.5K do vírus da vacina).

De preferência, as células bacterianas tais como *Escherichia coli*, e mais de preferência, células eucarióticas são usadas para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, as células de mamífero tais como células de ovário de hamster Chinês (CHO), conjuntamente com um vector que possua o principal elemento do promotor do gene precoce intermédio de citomegalovírus humano é um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foecking, et al. (1986) Gene 45:101; Cockett et al. (1990) Bio/Technology 8:2).

Nos sistemas bacterianos, uma série de vectores de expressão podem ser vantajosamente seleccionados dependendo do uso pretendido para a molécula de anticorpo expressa. Por exemplo, quando se pretende produzir uma grande quantidade de proteína, como seja, e.g., para a geração de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, podem ser então desejáveis vectores que dirijam a expressão de níveis elevados de produtos de proteína de fusão, os quais são facilmente purificados. Tais vectores incluem, e.g., sem limites, o vector de expressão de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)), em que a sequência codificadora de anticorpos pode ser ligada individualmente ao vector em grelha com a região codificadora de lacZ de forma que uma proteína de fusão

seja produzida; vectores pIN (Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3 101-3 109 (1985); Van Heeke and Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)); e similares. Os vectores pGEX podem ser igualmente usados para expressar polipéptidos estranhos como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST).

Em geral, tais proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas a partir de células lisadas através de adsorção e ligação a uma matriz de esferas de glutathione-agarose, seguidas de eluição na presença de glutathione livre. Os vectores pGEX são projectados para incluir locais de clivagem por, e.g., trombina ou factor Xa de forma que o produto do gene alvo clonado possa ser libertado da porção GST. Um sistema de insecto usado como um vector para expressar um gene estranho, é o sistema do vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). O vírus AcNPV replica-se em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência codificadora de anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (e.g., o gene da poliedrina) do vírus e colocado sob o controle de um promotor AcNPV (e.g., o promotor da poliedrina).

Nas células hospedeiras de mamífero, pode ser usada uma série de sistemas de expressão baseados em vírus. Nos casos em que um adenovírus é usado como um vector de expressão, a sequência codificadora de anticorpo com interesse pode ser ligada a um complexo de controlo da

transcrição/tradução de adenovírus, e.g., o promotor tardio e a sequência do líder tripartido. Este gene quimérico pode então ser inserido no genoma de adenovírus usando recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção numa região não essencial do genoma viral (e.g., região E1 ou E3) resulta num vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a molécula de anticorpo em hospedeiros infectados (ver, e.g., Logan & Shenk, 1984 PNAS 81:355-9). Podem ser necessários sinais de iniciação específicos para a tradução eficiente das sequências codificadoras de anticorpo inseridas. Estes sinais incluem, e.g., o codão de iniciação ATG e sequências adjacentes. Ainda, o codão de iniciação deverá estar em fase com a grelha de leitura da sequência codificadora pretendida para assegurar a tradução correcta de todo o inserto. Estes sinais de controlo da tradução exógenos e codões de iniciação podem ser de uma variedade de origens, tanto natural como sintético.

A eficiência de expressão pode ser estimulada pela inclusão de elementos adequados estimuladores da transcrição, terminadores da transcrição, etc. (ver, e.g., Bittner et al., 1987 Methods in Enzymol. 153:51-4). Ainda, uma estirpe de célula hospedeira pode ser escolhida de forma a modular a expressão da sequência inserida ou modificar e processar o produto do gene da forma específica pretendida. Tais modificações (e.g., glicosilação) e processamento (e.g., clivagem) de produtos proteicos podem ser importantes para a função de uma proteína.

Células hospedeiras diferentes possuem mecanismos característicos e específicos para o processamento pós-tradução e modificação de proteínas e produtos de genes. Linhas celulares ou sistemas hospedeiros adequados podem ser escolhidos de forma a assegurar a modificação e processamento correctos de uma proteína estranha que é expressa. Com este objectivo, podem ser usadas células hospedeiras eucarióticas que possuem a maquinaria celular para o processamento correcto do transcrito primário, glicosilação e fosforilação. Tais células hospedeiras de mamífero incluem, *e.g.*, sem limitações, CHO, VERO, BJH, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138 e, em particular, linhas celulares de cancro da mama tais como, *e.g.*, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D e linhas celulares de glândula mamária normal como sejam, *e.g.*, CRL7030 e Hs578Bst.

O invento inclui anticorpos fundidos por via recombinante ou quimicamente conjugados (incluindo conjugações covalentes e não covalentes) com um polipéptido (ou porção do mesmo, de preferência compreendendo pelo menos: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 aminoácidos contíguos do polipéptido) para gerar proteínas de fusão. A fusão não necessita necessariamente de ser directa, mas pode ocorrer através de sequências de ligação.

Os anticorpos fundidos ou conjugados com um polipéptido pode também ser usado em imunoensaios *in vitro* e em métodos de purificação usando métodos conhecidos na área (ver *e.g.*, Harbor, *et al.*, *supra*, e WO 9312 1232; EP

439 095; Naramura et al. (1994) Immunol. Lett. 39:91-9; Patente U.S. N° 5474981; Gillies et al., 1992 PNAS 89:1428-32; Fell et al., 1991 J. Immunol. 146:2446-52).

O invento ainda inclui composições compreendendo um polipéptido (ou fragmento do mesmo) fundido ou conjugado com um domínio de anticorpo que não seja uma região variável. Por exemplo, um polipéptido do invento (ou fragmento do mesmo) pode ser fundido ou conjugado com uma região constante de anticorpo, região D ou J ou uma região Fc ou porção da mesma. A porção de anticorpo que é fundida com um polipéptido do invento (ou fragmento do mesmo) pode compreender uma região constante, uma região de charneira, um domínio CH1, um domínio CH2 e/ou um domínio CH3 ou qualquer combinação de domínios completos ou porções dos mesmos. Um polipéptido (ou fragmento do mesmo) pode ser também fundido ou conjugado com uma porção de anticorpo aqui descrito para formar multímeros. Por exemplo, as porções Fc fundidas com um polipéptido do invento (ou fragmento do mesmo) podem formar dímeros através de ligações dissulfureto entre as porções Fc. Formas multiméricas maiores podem ser formadas através da fusão dos polipéptidos a porções de IgA e IgM. Métodos para a fusão ou conjugação de um polipéptido do invento (ou fragmento do mesmo) a uma porção de anticorpo são conhecidos (ver, e.g., Patente U.S. Nos. 5336603; 5622929; 5359046; 5359046; 5349053; 5447851; 5112946; EP 307434; EP 367166; WO 96/04388; WO9106570; Ashkenazi, et al. (1991) PNAS 88:10535-10539; Zheng et al., (1995) J. Immunol. 154:5590-5600; e Vie et al., (1992) PNAS 89: 11337-11341).

Como aqui discutido, um polipéptido, fragmento de polipéptido, pode ser fundido ou conjugado com uma porção de anticorpo aqui descrita ou conhecida na área para aumentar a semi-vida *in vivo*. Ainda, um polipéptido, fragmento polipeptídico, pode ser fundido ou conjugado com uma porção de anticorpo para facilitar a purificação. Um exemplo usa proteínas quiméricas compreendendo os dois primeiros domínios da polipéptido CD4 humano e vários domínios das regiões constantes das cadeias pesadas ou leves de imunoglobulinas de mamífero. (ver, e.g., EP 394827; Traunecker et al. (1988) Nature 331:84-86).

Em muitos casos, a parte Fc de uma proteína de fusão é benéfica em terapia e diagnóstico e assim, pode resultar em, e.g., melhores propriedades farmacocinéticas (ver, e.g., EP A232 262). Como alternativa, a eliminação da parte Fc, após a proteína de fusão ser expressa, detectada e purificada, pode ser favorecida. Por exemplo, a porção fc pode impedir a terapia e diagnóstico se a proteína de fusão for usada como um antigénio para imunizações. Na descoberta de fármacos, e.g., proteínas humanas, tais como hIL-5, têm sido feitas fusões com porções Fc em ensaios de rastreio de elevado número de amostras para identificar antagonistas de hIL-5 (ver, e.g., Bennett et al. (1995) J. Molecular Recognition 8:52-58; Johanson et al., (1995) J. Biol.Chem. 270:9459-9471).

Ainda, uma composição de ligação (ou fragmento da

mesma) pode ser fundida a sequências de marcas, como seja um péptido que facilite a purificação. Em realizações preferidas, a sequência de aminoácidos da marca é um péptido de hexa-histidina, como seja a cauda proporcionada num vector pQE (Qiagen, inc., Chastsworth, CA), entre outros, muitos dos quais podem ser comprados. A hexa-histidina oferece uma purificação adequada de uma proteína de fusão (Gentz, et al., (1989) PNAS 86:821-824). Outras marcas peptídicas para purificação incluem, e.g., a cauda "HA" que corresponde a um epitopo derivado da proteína hemaglutinina da gripe (Wilson et al., (1984) Cell 37:767) e a marca "flag".

O invento ainda inclui anticorpos ou fragmentos de anticorpos conjugados com um agente de diagnóstico ou de terapêutica. Os anticorpos podem ser usados em diagnóstico para, por exemplo, monitorizar o desenvolvimento ou progressão de um tumor como parte de um procedimento de ensaio clínico para determinar a eficácia de um determinado regime de tratamento. A detecção pode ser facilitada pela acoplagem do anticorpo a uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem, e.g., várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioactivos, metais emissores de positrões usando várias tomografias de emissão de positrões e iões metálicos paramagnéticos não radioactivos. A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada, directamente ao anticorpo (ou seu fragmento) ou indirectamente, através de

um intermediário (como seja, e.g., um elemento de ligação conhecido na área) usando técnicas estabelecidas (ver, e.g., Patente US N° 4741900 para iões metálicos que podem ser conjugados com anticorpo para usar em diagnóstico de acordo com o invento). Exemplos de enzimas adequadas incluem e.g., sem limites, peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos com grupos prostéticos adequados incluem, e.g., sem limites, estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem, e.g., sem limitações, umbeliferona, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui, e.g., sem limites, luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem, e.g., sem limites, luciferase, luciferina e aquorina; e exemplos de um material radioactivo incluem, e.g., ^{125}I , ^{131}I , ^{111}I ou ^{99}Tc .

Uma composição de ligação do invento pode também ser ligada a suportes sólidos, os quais são particularmente úteis para imunoensaios ou purificação de um antigénio alvo. Tais suportes sólidos incluem, e.g., sem limites, vidro, celulose, poliacrilamida, nylon, polistireno, cloreto de polivinilo ou polipropileno. Técnicas para a conjugação de um elemento terapêutico a um anticorpo são conhecidas, ver, e.g., Amon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", em "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Reisfeld et al.

(eds.) pp. 243-56 (Alan R. liss, Inc. 1985); Hellstrom, et al., "Antibodies for Drug Delivery", em Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.) pp. 623-53 (Marcel Dekker, inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", em "Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin, et al., (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) e Thorpe et al., "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982).

B. Imunoensaios

Uma proteína particular, como seja TGF Beta 1, pode ser medida por uma variedade de métodos de imunoensaio incluindo, e.g., sem limites, sistemas de ensaio competitivos e não competitivos que usam técnicas tais como, e.g., sem limites, transferências Western, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunossorvente ligado a enzimas), imunonsaios tipo "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, reacções de precipitina, reacções de precipitina por difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imuno-radiométricos, imunoensaios fluorescentes e imunoensaios com proteína A. Para uma revisão de

procedimentos imunológicos e imunoensaios em geral ver Stites and Terr (eds.) (1991) Basic and Clinical Immunology (7th ed.). Ainda, os imunoensaios do invento podem ser realizados em muitas configurações, as quais estão revistas extensivamente em Maggio (ed.) (1980) Enzyme Immunoassay CRC Press, Boca Raton, Florida; Gosling J P 2000 Immunoassays: A Practical Approach (Practical Approach Séries) Oxford Univ Press; Diamandis & Christopoulos, 1996 Immunoassay Academic Press, San Diego, CA; Tijan (1985) "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam; Wild, D. (Ed.), 2001 The Immunoassay Handbook (2nd edition) Nature Pub Group; James T. Wu, 2000 Quantitative Immunoassay: A Practical Guide for Assay Establishment, Troubleshooting and Clinical Application, Amer Assn for Clinical Chemistry, Brousseau & Beaudet (Eds.) Manual of Immunological Methods CRC Press Boca Raton, Florida; e Harlow and Lane Antibodies, A Laboratory Manual, *supra*. Ver igualmente Chan (ed.) (1987) Immunoassay: A Practical Guide Academic Press, Orlando, FL; Proce and Newman(eds.) (1991) Principles and Practice of Immunoassays Stockton Press, NY; e Ngo (ed.) (1988) Non-isotopic Immunoassays Plenum press, NY.

Os imunoensaios para medição podem ser realizados por uma variedade de métodos conhecidos. Resumidamente, os imunoensaios para medir a proteína podem ser ensaios de ligação competitivos ou não competitivos. Nos ensaios de ligação competitivos, a amostra a ser analisada compete com

um analito marcado relativamente a locais de ligação específicos num agente de captura ligado a uma superfície sólida. De preferência, o agente de captura é um anticorpo especificamente reactivo com uma proteína TGF Beta 1 como aqui descrito. A concentração de analito marcado ligado ao agente de captura é inversamente proporcional à quantidade do analito livre presente na amostra.

Num imunoensaio de ligação competitivo, a proteína alvo presente na amostra compete com a proteína marcada para a ligação a uma composição de ligação específica, por exemplo uma composição de ligação, como seja um anticorpo, que é especificamente e/ou selectivamente reactivo com a proteína alvo. A composição de ligação pode ser ligada a uma superfície sólida para efectuar a separação da proteína marcada ligada da proteína marcada não ligada. Como alternativa, o ensaio de ligação competitivo pode ser realizado em fase líquida e uma variedade de técnicas conhecidas na área podem ser usadas para separar proteína marcada ligada da proteína marcada não ligada. Após separação, foi determinada a quantidade de proteína marcada ligada. A quantidade de proteína presente na amostra é inversamente proporcional à quantidade de ligação de proteína marcada.

Como alternativa, pode ser realizado um imunoensaio homogéneo em que não é necessário um passo de separação. Nestes imunoensaios, a marca na proteína é alterada através da ligação da proteína à sua composição de

ligação específica. Esta alteração na proteína marcada resulta num decréscimo ou aumento do sinal emitido pela marca, de forma que a medição da marca no final do imunoensaio permite a detecção ou a quantificação da proteína.

Os ensaios competitivos são também particularmente úteis, em que as células são colocadas em contacto e incubadas com um parceiro de ligação ou anticorpo marcado tendo afinidade de ligação para a proteína, como seja ^{125}I -anticorpo e uma amostra a testar cuja afinidade de ligação à composição de ligação se está a medir. As composições de ligação marcadas ligadas e livres são então separadas para avaliar o grau de ligação da proteína. A quantidade do composto a testar ligado é inversamente proporcional à quantidade do parceiro de ligação marcado que se liga à fonte conhecida. Pode ser usada qualquer uma de várias técnicas para separar a proteína ligada da livre. Este passo de separação poderá tipicamente envolver um processo como seja adesão a filtros, seguida de lavagem, adesão a plástico, seguido de lavagem ou centrifugação das membranas celulares. As células viáveis poderão também ser usadas para testar os efeitos de fármacos na função mediada pela proteína TGF beta (e.g., níveis de mensageiro secundário, tais como, e.g., proliferação celular; alterações da reserva de fosfato de inositol, transcrição usando um ensaio do tipo luciferase; e outros). Alguns métodos de detecção permitem a eliminação de um passo de separação, e.g., um sistema de detecção despoletado pela proximidade.

A análise qualitativa ou quantitativa de proteínas pode também ser determinada por uma variedade de métodos de imunoensaio não competitivos. Por exemplo, pode ser usado um imunoensaio de sanduíche em fase sólida de dois locais de ligação. Neste tipo de ensaio, uma composição de ligação para a proteína, por exemplo um anticorpo, é ligado a um suporte sólido. Uma segunda composição de ligação a proteína, a qual pode ser um anticorpo e que se liga à proteína num local de ligação diferente, é marcada. Após ter ocorrido a ligação de ambos os locais na proteína, a composição de ligação marcada não ligada é removida e a quantidade de composição de ligação marcada ligada à fase sólida é medida. A quantidade de composição de ligação marcada ligada é directamente proporcional à quantidade de proteína na amostra.

Os formatos de imunoensaio atrás descritos empregam componentes do ensaio marcados. A marca pode ser acoplada directamente ou indirectamente ao componente pretendido do ensaio de acordo com métodos conhecidos na área. Pode ser usada uma variedade de marcas e métodos. Tradicionalmente, era usada uma marca radioactiva com ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C ou ^{32}P . As marcas não radioactivas incluem proteínas, as quais se ligam a anticorpos marcados, fluoróforos, agentes quimioluminescentes, enzimas e anticorpos, os quais podem servir como membros do par de ligação específica para uma proteína marcada. A escolha da marca depende da sensibilidade necessária, facilidade de

conjugação com o composto, necessidade de estabilidade e instrumentação disponíveis. Para uma revisão de vários sistemas de marcação ou produção de sinal, que podem ser usados, ver Patente U.S. N° 4391904.

As composições de ligação de anticorpo reactivas com uma proteína particular podem também ser medidas por uma variedade de métodos de imunoensaio. Para uma revisão de procedimentos imunológicos e de imunoensaio aplicáveis à medição de anticorpos por técnicas de imunoensaio, ver Stites e Terr (eds.) Basic and Clinical Immunology (7th ed.) *supra*; Maggio (ed.) Enzyme Immunoassay, *supra*, e Harlow e Lane Using Antibodies, A Laboratory Manual, *supra*.

Resumidamente, os imunoensaios para medir anti-soro reactivo com a proteína alvo podem ser ensaios competitivos ou não competitivos. Em ensaios de ligação competitivos, o analito da amostra compete com um analito marcado para locais de ligação específica num agente de captura ligado a uma superfície sólida. De preferência, o agente de captura é uma proteína recombinante purificada. Podem ser usadas outras fontes de proteínas, incluindo proteína natural isolada ou parcialmente purificada. Os ensaios não competitivos incluem ensaios de sanduíche, em que o analito da amostra é ligado entre dois reagentes de ligação específica ao analito. Uma das composições de ligação é usada como um agente de captura e ligada a uma superfície sólida. A segunda composição de ligação é marcada e é usada para medir ou detectar o complexo

resultante através de meios visuais ou instrumentais. Pode ser usada uma série de combinações do agente de captura e da composição de ligação marcada. Uma variedade de diferentes formatos de imunoensaio, técnicas de separação e marcas podem ser usados de forma semelhante aos descritos atrás para a medição de uma proteína.

A capacidade do anticorpo de interesse para imunoprecipitar um antígeno particular pode ser avaliada por, e.g., análise de transferência Western. Os familiarizados com a matéria saberão quais os parâmetros modificáveis para aumentar a ligação de um anticorpo a um antígeno e para baixar o fundo (e.g., através da pré-clarificação do lisado celular com esferas de sefarose). Discussão adicional dos protocolos de imunoprecipitação pode ser encontrada em, e.g., Ausubel et al., eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Um ensaio de ELISA compreende a preparação de um antígeno, revestimento do alvéolo de uma placa de microtitulação de 96 alvéolos com o antígeno, adição do anticorpo de interesse conjugado com um composto detectável como seja um substrato enzimático (e.g., peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina) ao alvéolo e incubação durante um período de tempo e detecção da presença do antígeno. Em ELISAs, o anticorpo de interesse não tem de ser conjugado com um composto detectável; em seu lugar, um segundo anticorpo (o qual reconhece o anticorpo

de interesse) conjugado com um composto detectável pode ser adicionado ao alvéolo. Ainda, em vez do revestimento do alvéolo com o antigénio, o anticorpo pode ser usado para revestir o alvéolo. Neste caso, um segundo anticorpo conjugado com um composto detectável pode ser adicionado após a adição do antigénio de interesse ao alvéolo revestido. Qualquer um relacionado com a área pode determinar sem experimentação adicional quais os parâmetros a ajustar, e.g., para aumentar o sinal assim como outras variações de um ELISA que devam ser usadas (ver, e.g., Ausubel, et al., eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

A afinidade de ligação de um anticorpo a um antigénio e a velocidade de associação e dissociação de uma interacção anticorpo-antigénio podem ser determinadas através, e.g., da utilização de um ensaio de ligação competitivo. Um exemplo não limitante é um radioimunoensaio compreendendo incubação do antigénio marcado (e.g., usando ^3H ou ^{125}I) com um anticorpo de interesse na presença de quantidades crescentes de antigénio não marcado e depois detecção da quantidade de anticorpo ligado ao antigénio marcado. A afinidade do anticorpo de interesse para um antigénio particular e as velocidades de dissociação podem ser determinadas a partir dos dados de, e.g., análise de gráficos Scatchard. A competição com um segundo anticorpo pode também ser determinada usando, e.g., radioimunoensaios. Neste caso, o antigénio é incubado com o anticorpo de interesse conjugado com um composto marcado

(e.g., ^3H ou ^{125}I) na presença de quantidades crescentes de um segundo anticorpo não marcado.

Variantes físicas

O invento também inclui sequências polipeptídicas cujas sequências de aminoácidos possuem semelhança e/ou identidade substancial com uma sequência de aminoácidos aqui descrita. A semelhança ou identidade entre sequências de aminoácidos é determinado através da otimização da correspondência de identidade entre aminoácidos. Esta altera-se quando as substituições conservadas são consideradas como correspondências de identidade. As substituições conservadas tipicamente incluem substituições dentro dos seguintes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutâmico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; e fenilalanina, tirosina. Ver também Needleham et al., (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; Sankoff et al. (1983) Time Warps, String Edits and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison Chapter One, Addison-Wesley, Reading, MA; e pacotes de programas informáticos da IntelliGenetics, Mountain View, CA; e o University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI.

O invento inclui, mas não está limitado a sequências polipeptídicas que estão funcionalmente relacionados com um polipéptido codificado por um identificador de sequências específico do presente pedido.

Polipéptidos funcionalmente relacionados incluem qualquer polipéptido que partilha uma característica funcional com uma composição de ligação (e.g., a capacidade para selectivamente e/ou especificamente se ligar a TGF Beta 1 e não se ligar a TGF Beta 2 e/ou 3). Tais polipéptidos funcionalmente relacionados incluem, sem limitações, adições ou substituições de resíduos de aminoácidos codificados pelas sequências aqui descritas; particularmente, as que resultam numa alteração silenciosa, produzindo assim um polipéptido funcionalmente equivalente. As substituições de aminoácidos podem ser feitas com base em semelhança da polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e/ou a natureza anfipática dos resíduos envolvidos.

Por exemplo, os aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina; os aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina; os aminoácidos carregados positivamente (básicos) incluem arginina, lisina e histidina; e aminoácidos carregados negativamente (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico.

Ainda, os aminoácidos não clássicos ou os análogos de químicos de aminoácidos podem ser substituídos ou adicionado a uma sequência polipeptídica. Os aminoácidos não clássicos incluem, e.g., sem limites, D-isómeros dos aminoácidos comuns; ácido 2,4-diaminobutírico; um ácido

isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-amino-hexanóico, Aid, ácido 2-amino-isobutírico, ácido 3-aminopropiônico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cístico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclo-hexilalanina, b-alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos designer tais como b-metil-aminoácidos, Ca-metilaminoácidos, Na-metilaminoácidos e análogos de aminoácidos em geral. Ainda, o aminoácido pode ser dextrógiro (D) ou levrógiro (L).

Adições de partes peptídicas para facilitar a manipulação são técnicas familiares e de rotina. Ainda, uma composição de ligação (incluindo qualquer fragmento do mesmo e especificamente um epitopo) pode ser combinada com partes do domínio constante de uma imunoglobulina e.g., (IgA, IgE, IgG, IgM) partes das mesmas (CH1, CH2, CH3) e qualquer combinação destas, incluindo domínios completos e seus fragmentos), resultando num polipéptido quimérico. Tais proteínas de fusão podem facilitar a purificação e muitas vezes são úteis para aumentar a semi-vida *in vivo* da proteína. Por exemplo, isto foi demonstrado para proteínas quiméricas compreendendo os dois primeiros domínios de um polipéptido CD4 humano e vários domínios das regiões constantes das cadeias pesada ou leve de imunoglobulinas de mamífero (EP 394827; Traunecker, et al., 1988 Nature 331:84-6). Proteínas de fusão com estruturas diméricas ligadas por pontes dissulfureto (devido ao domínio IgG) podem também ser mais eficientes na ligação e neutralização

de outras moléculas do que uma proteína monomérica secretada ou fragmento proteico isolado (Fountoulakis et al., 1995, J Biochem. 15 270:3958-64). Uma maior passagem de um antigénio através de uma barreira epitelial para o sistema imune foi demonstrada para antigénios (e.g., insulina) conjugados com um parceiro de ligação FcγR, como seja IgG ou fragmentos Fc (ver, e.g., WO 96/22024 e WO 99/104813).

Ainda, uma proteína de fusão pode compreender várias porções da região constante de uma molécula de imunoglobulina juntamente com uma proteína humana (ou parte da mesma). Em muitos casos, a parte Fc numa proteína de fusão é benéfica em terapia e diagnóstico e, assim, pode resultar em, e.g., melhores propriedades farmacocinéticas. Como alternativa, pode ser pretendida a deleção da parte Fc após a proteína de fusão ter sido expressa, detectada e purificada. Por exemplo, a porção Fc pode mascarar a terapia e/ou diagnóstico se a proteína de fusão for usada como um imunogénio para imunizações. Por exemplo, na descoberta de fármacos proteínas humanas foram fundidas com porções Fc com o objectivo de fazer ensaios de rastreio com elevado número de amostras para identificar antagonistas.

Ainda, podem ser feitas novas construções através da combinação de domínios funcionais semelhantes de outras proteínas. Por exemplo, segmentos de ligação a proteína ou outros podem ser "permutados" entre diferentes polipéptidos novos ou fragmentos de fusão. Assim, novos polipéptidos

quiméricos apresentando novas combinações de especificidades resultarão da ligação funcional de domínios com especificidades de ligação a proteínas e de outros domínios funcionais. Ainda, podem ser geradas construções de fusão através de técnicas de inserções ao acaso de genes, inserções ao acaso de motivos, inserções ao acaso de exões e/ou inserções ao acaso de codões.

"Substancialmente puro" refere-se a ácido nucleico, proteína ou polipéptido que é removido do seu ambiente natural e isolado e/ou separado de outras proteínas, ácidos nucleicos e outros produtos biológicos contaminantes. A pureza ou o "isolamento" pode ser testado por meios convencionais e normalmente será pelo menos cerca de 50% puro, mais frequentemente pelo menos cerca de 60% puro, geralmente pelo menos cerca de 70% puro, mais geralmente pelo menos cerca de 80% puro, frequentemente pelo menos cerca de 85% puro, mais frequentemente pelo menos cerca de 90% puro, de preferência pelo menos cerca de 95% puro, mais preferencialmente pelo menos cerca de 98% puro e nas realizações mais preferidas pelo menos 99% puro. Conceitos semelhantes são aplicados, *e.g.*, às composições de ligação, *e.g.*, tais como anticorpos do invento. Por exemplo, pode ser desejável purificar um polipéptido a partir de proteínas ou polipéptidos de células recombinantes.

A "solubilidade" de uma proteína ou polipéptido reflecte-se através da medição da sedimentação em unidades

Svedberg, as quais são uma medida da velocidade de sedimentação de uma molécula em condições particulares. A determinação da velocidade de sedimentação era classicamente realizada numa ultracentrífuga analítica, mas agora é tipicamente realizada numa ultracentrífuga convencional (ver Freifelder 1982 *Physical Biochemistry* (2d Ed.) W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA; e Cantor e Schimmel (1980) *Biophysical Chemistry* parts 1-3, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA). Numa determinação pouco precisa, uma amostra contendo um polipéptido putativamente solúvel é centrifugada numa ultracentrífuga convencional a cerca de 50 K rpm durante cerca de 10 minutos e as moléculas solúveis permanecerão no sobrenadante. Uma partícula ou polipéptido solúvel será tipicamente inferior a cerca de 30S, mais tipicamente inferior a cerca de 15S, geralmente menos de cerca de 10S, mais geralmente inferior a cerca de 6S e em realizações particulares, de preferência menos de cerca de 4S e mais de preferência menos de cerca de 3S. A solubilidade de um polipéptido ou fragmento depende do ambiente e do polipéptido. Muitos parâmetros afectam a solubilidade do polipéptido, incluindo temperatura, ambiente de electrólitos, tamanho e características moleculares do polipéptido e natureza do solvente. Tipicamente, a temperatura a que o polipéptido é usado varia entre cerca de 4°C e cerca de 65°C. Geralmente a temperatura usada é superior a cerca de 18°C e mais geralmente superior a cerca de 22°C. Para fins de diagnóstico, a temperatura será geralmente entre aproximadamente a temperatura ambiente ou ligeiramente superior,

mas inferior à temperatura de desnaturação dos componentes do ensaio. Para fins terapêuticos, a temperatura será geralmente a temperatura do corpo, tipicamente cerca de 37°C para os seres humanos, ainda que em determinadas situações a temperatura possa ser aumentada ou baixada *in situ* ou *in vitro*. O tamanho e a estrutura do polipéptido deverá estar, de um modo geral, num estado substancialmente estável e, geralmente, não num estado desnaturado. O polipéptido pode estar associado a outros polipéptidos numa estrutura quaternária, e.g., para conferir solubilidade, ou associado a lípidos ou detergentes de uma forma que se aproxima das interações naturais das bicamadas lipídicas.

O solvente será geralmente um tampão biologicamente compatível, de um tipo usado para preservação de actividades biológicas, e de um modo geral aproximar-se-á de um solvente fisiológico. Geralmente o solvente terá um pH neutro, tipicamente entre cerca de 5 e 10, e de preferência cerca de 7,5. Em algumas ocasiões, será adicionado um detergente, tipicamente um não desnaturante suave, e.g., CHS (colesteril hemi-succinato) ou CHAPS (3-[3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanossulfonato) ou uma concentração suficiente baixa para evitar a destruição significativa de propriedades estruturais ou fisiológicas da proteína. Numa realização preferida, a solubilidade de uma composição de ligação do invento (pH 5,0-6,0 e NaCl 150 mM) é superior a 10, 15, 20, 25, 30, 35 ou 40 mg/ml; numa realização mais preferida, mais de 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 mg/ml; numa realização ainda mais

preferida, superior a 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ou 60 mg/ml, numa realização ainda mais preferida superior a 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140 ou 150 mg/ml (ou numa gama entre quaisquer dois destes valores, gama essa que pode ou não incluir um ou ambos os pontos terminais).

Variantes

São também descritos polipéptidos que compreendem ou alternativamente consistem numa sequência de aminoácidos que é pelo menos: 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica a, e.g., uma sequência polipeptídica do invento (ou fragmentos da mesma). Usando métodos conhecidos na área pode-se determinar se uma sequência particular apresenta identidade com uma sequência da composição de ligação.

Tipicamente, em tal comparação de sequências, uma sequência actua como sequência de referência, com a qual são comparadas as sequências a testar. Quando da utilização de um algoritmo de comparação de sequências, as sequências a testar e de referência são introduzidas num computador, subsequentemente as coordenadas são designadas, se necessário, e são designados os parâmetros do programa do algoritmo de sequências. O algoritmo de comparação de sequências calcula então a percentagem de identidade das sequências para uma sequência a testar relativamente à sequência de referência, baseado nos parâmetros de um programa designado.

O alinhamento óptimo de sequências para comparação pode ser realizado, *e.g.*, pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482, pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol.Biol.* 48:443, através de pesquisa pelo método de similaridade de Pearson e Lipman (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444, por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), a suite de computação bioinformática LASERGENE, a qual é produzida pela DNASTAR (Madison, Wisconsin), pelos métodos de alinhamento de múltiplas sequências desenvolvidos por Notredame, *et al.*, (*e.g.*, 3Dcoffee ou Tcoffee em, *e.g.*, *Nucleic Acids Res.* 2004:32 (Web Server issue):W37-40; *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul1;31(13):3503-6; ou *Pharmacogenetics* 2002 Jan;3(1): 131-4)) ou através de inspecção visual (ver de um modo geral, Ausubel *et al.*, *supra*). Outros métodos para comparação das sequências nucleotídicas ou de aminoácidos através da determinação do alinhamento óptimo são conhecidos na área (ver *e.g.*, Peruski and Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular research* (ASM Press, Inc. 1997); Wu, *et al.* (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins" em *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); ou Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing*, 2nd Edition (Academic Press, Inc. 1998)).

Um polipéptido que apresente ou possua pelo menos cerca de, e.g., 95% de "identidade de sequências" com uma outra sequência de aminoácidos pode incluir, e.g., até cinco alterações de aminoácidos por cada segmento de 100 aminoácidos. Por outras palavras, uma primeira sequência de aminoácidos que seja pelo menos 95% idêntica a uma segunda sequência de aminoácidos, pode ter até 5% do seu número total de resíduos de aminoácidos diferente da segunda sequência, e.g., através da inserção, deleção ou substituição de um resíduo de aminoácido. As alterações nos resíduos de aminoácidos de uma sequência polipeptídica podem ocorrer, e.g., nas posições do extremo amina ou carboxilo ou em qualquer local entre estas posições terminais, dispersos individualmente entre resíduos na sequência ou numa ou mais secções, porções ou fragmentos de resíduos de aminoácidos contíguos dentro da sequência. Por questões práticas, se qualquer sequência polipeptídica particular apresenta pelo menos cerca de: 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de similaridade com uma outra sequência, por exemplo, como aqui mostrado numa Tabela, pode ser determinado usando métodos conhecidos.

As variantes aqui descritas podem conter alterações nas regiões codificadoras, regiões não codificadoras ou em ambas. Ainda, as variantes em que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos são substituídos, eliminados ou adicionados em qualquer combinação estão também aqui descritas. As variantes não naturais podem ser produzidas

por técnicas de mutagénese ou por síntese directa usando métodos conhecidos de tecnologia de engenharia de proteínas e de DNA recombinante. Tais variantes podem ser geradas para melhorar ou alterar as características de um polipéptido (ou seu fragmento) de uma composição de ligação. Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser eliminados do extremo N ou do extremo C de um polipéptido secretado do invento (ou fragmento do mesmo) sem uma perda substancial da função biológica. Por exemplo, Ron, et al., 1993 J. Biol. Chem. 268:2984-8, descreveram proteínas KGF variantes tendo actividade de ligação a heparina mesmo após deleção de 3, 8 ou 27 resíduos de aminoácidos do extremo amina. Por exemplo, a antigenicidade e/ou imunogenicidade pode ser mantida (e.g., a capacidade de uma variante de deleção para induzir e/ou se ligar a anticorpos que reconhecem uma forma madura de um polipéptido) quando menos que a maioria dos resíduos da forma secretada são removidos do extremo N ou do extremo C. Usando métodos de rotina aqui descritos e conhecidos na área, pode ser facilmente determinado se um polipéptido sem os resíduos terminais N ou C de uma proteína retém tais actividades. Assim, o invento também engloba, e.g., variantes polipeptídicas que apresentam actividade biológica como seja, e.g., imunogenicidade ou antigenicidade. Tais variantes incluem, e.g., deleções, inserções, repetições e substituições seleccionadas de forma a terem pouco efeito na actividade usando regras gerais conhecidas na área. Por exemplo, os ensinamentos sobre como preparar substituições silenciosas de aminoácidos são proporcionados, e.g., por Bowie, et al. (1990) Science 247:1306-1310.

Para além de usarem substituições de aminoácidos conservadas, outras variantes do invento incluem mas não estão restringidas a, *e.g.*, (i) substituições de um ou mais dos resíduos de aminoácidos não conservados, pelo que os resíduos de aminoácidos substituídos podem ou não ser codificados pelo código genético ou (ii) substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos tendo um grupo substituinte ou (iii) fusão do polipéptido maduro com um outro composto, como seja um composto para aumentar a estabilidade e/ou solubilidade do polipéptido (*e.g.*, polietilenoglicol) ou (iv) fusão do polipéptido com aminoácidos adicionais, tais como *e.g.*, um péptido da região de fusão Fc de IgG ou sequência líder ou secretória ou uma sequência que facilite a purificação. Todas estas variantes estarão dentro do âmbito dos familiarizados com área da biologia molecular considerando os ensinamento dos requerentes aqui apresentados, *e.g.*, especificando sequências polinucleotídicas e polipeptídicas únicas.

Por exemplo, as variantes polipeptídicas contendo substituições de aminoácidos carregados por outros aminoácidos carregados ou neutros pode produzir polipéptidos com melhores características *e.g.*, como seja com menos agregação. A agregação de formulações farmacêuticas reduz a actividade e aumenta a eliminação devido à actividade imunogénica dos agregados (Pinckard, *et al.*, (1967) Clin. Exp. Immunol. 2:331-340; Robbins *et al.*, (1987) Diabetes 36:838-845; Cleland *et al.*, (1993) Crit.

Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377). Numa realização preferida, uma composição de ligação do invento formulada num sistema pH/tampão adequado (como aqui descrito ou conhecido na área) não apresenta agregação significativa após incubação durante pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 meses em condições de temperatura na gama de aproximadamente 1-10°C, mais de preferência 2-8°C, mesmo mais de preferência 3-7°C e mesmo mais de preferência 5-6°C.

Também é descrita uma composição que compreende uma sequência de aminoácidos do invento contendo pelo menos uma substituição de aminoácidos, mas não mais de 50 substituições de aminoácidos, mesmo mais de preferência, não mais de 40 substituições de aminoácidos, ainda mais de preferência, não mais de 30 substituições de aminoácidos e ainda mais de preferência não mais de 20 substituições de aminoácidos, nem mais de 15 substituições de aminoácidos. É igualmente descrito um péptido ou polipéptido que possui uma sequência de aminoácidos que compreende uma sequência de aminoácidos do invento, a qual contém pelo menos: uma, mas não mais de: 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 substituições de aminoácidos. O número de adições, substituições e/ou deleções numa sequência polipeptídica do invento ou seus fragmentos pode ser pelo menos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 10-50 ou 50-150; em que as substituições de aminoácidos conservadas são mais preferidas do que as substituições não conservadas.

Utilizações terapêuticas

Este invento também proporciona reagentes com valor terapêutico útil. As composições de ligação terapêuticas do invento incluem, e.g., sem limites, composições de ligação de anticorpos do invento (incluindo fragmentos, análogos e seus derivados como aqui descrito) e moléculas de ácido nucleico codificadores das mesmas (incluindo fragmentos, análogos e seus derivados e anticorpos anti-idiotípicos como aqui descrito). Tal anticorpo pode ser usado para modular, tratar, inibir, melhorar ou prevenir doenças, perturbações ou condições associadas à expressão aberrante e/ou actividade de TGF Beta 1 (ou fragmento do mesmo) incluindo, e.g., sem limites, qualquer uma ou mais das doenças, perturbações, síndromes ou condições aqui descritas. O tratamento, melhoria e/ou prevenção de doenças, perturbações ou condições associadas à expressão aberrante e/ou actividade de TGF Beta 1 incluem, e.g., sem limites, melhoria dos sintomas associados a estas doenças, perturbações ou condições.

Por exemplo, uma doença ou perturbação associada à expressão anormal ou sinalização anormal por TGF Beta 1 é um alvo de um antagonista de TGF Beta 1 como seja uma composição de ligação do invento. O invento engloba terapias baseadas em composições de ligação que envolvem a administração de uma composição de ligação a um animal, de preferência um mamífero, mais de preferência um primata

(e.g., um ser humano), para modular, tratar, inibir, afectar ou melhorar uma ou mais das doenças, perturbações ou condições aqui descritas. Por exemplo, apesar de não teoricamente restringidos, os anticorpos específicos de TGF Beta humano são eficazes em modelos animais para o tratamento de doenças em que o receptor de TGF (TGFR) é expresso em excesso. Foi demonstrado que o anti-soro contra TGF Beta é eficaz no tratamento de glomerulonefrite (Border *et al.*, 1990 *Nature* 346:371-4); e fibrose do pulmão (Giri *et al.*, 1993 *Thorax* 48:959-66). Consequentemente, novas composições de ligação do invento com melhores características também serão eficazes na melhoria das condições, estados ou doenças, tais como, e.g., doenças fibróticas e condições associadas a TGF Beta 1.

Composições de ligação recombinantes e/ou isoladas do invento, como seja, e.g., anticorpos, podem ser purificadas e administradas a um indivíduo para tratamento. Estes reagentes podem ser combinados para usar com outros ingredientes activos ou inertes, e.g., em veículos ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis, e.g., adjuvantes imunogénicos, juntamente com estabilizadores e excipientes fisiologicamente inócuos. Estas combinações podem ser esterilizadas por filtração e colocadas em formas de dosagem, como seja por liofilização em embalagens de dosagem ou guardadas como preparações aquosas estabilizadas. Este invento também engloba a utilização de anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, incluindo formas que não se ligam ao complemento.

Uma outra abordagem terapêutica incluída dentro do invento envolve a administração directa de reagentes, formulações ou composições por quaisquer técnicas de administração convencionais (tais como, e.g., sem limites, injeção local, inalação ou administração sistémica) a um indivíduo. O invento também proporciona uma embalagem ou kit farmacêutico compreendendo um ou mais recipientes cheios com um ou mais ingredientes das composições do invento e instruções tais como, e.g., para distribuição (tipicamente, numa forma prescrita por uma agência governamental reguladora da produção, utilização ou venda de fármacos ou produtos biológicos). Métodos para administração incluem administração intravenosa, intraperitoneal ou intramuscular, difusão transdérmica e outros. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis incluirão água, soro fisiológico, tampões e outros compostos descritos e.g., no Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJ.

Outras condições de desenvolvimento anormal aqui incluídas são conhecidas em tipos celulares que possuem mRNA de TGF beta 1 por análise de transferências Northern (ver, e.g., Berkow (ed.) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn et al. Harrison's Principles of internal Medicine, McGraw-Hill, N.Y.; e Rich (ed.) Clinical Immunology; Principles and Practice, Mosby, St Louis (ed. actual); e abaixo). Anormalidades do desenvolvimento ou funcionais (e.g., do sistema neuronal, imune ou hematopoiético) causam anormalidades médicas

importantes e condições que podem ser susceptíveis à prevenção ou tratamento usando as composições aqui proporcionadas.

Uma outra abordagem terapêutica incluída neste invento envolve a administração directa de reagentes, formulações ou composições através de quaisquer técnicas de administração convencionais (tais como, e.g., sem limites, injeção local, inalação ou administração sistémica) a um indivíduo. Os reagentes, formulações ou composições incluídas podem ser direccionadas através de qualquer método aqui descrito ou conhecido na área. A dose de reagente, formulação ou composição que modula uma doença, perturbação, condição, síndrome, etc., depende de muitos factores, incluindo o tamanho e saúde de um organismo, no entanto os familiarizados com a área podem usar os ensinamentos que se seguem que descrevem métodos e técnicas para determinação das dosagens clínicas (ver, e.g., Spilker (1984) Guide to Clinical Studies and Developing Protocols, Raven press Books, Ltd., New York, pp. 7-13, 54-60; Spilker (1991) Guide to Clinical Trials, Raven Press, Ltd., New York, pp. 93-101; Craig and Stitzel (eds. 1986) Modern Pharmacology, 2d ed., Little, brown and Co., Boston, pp. 127-33; Speight (ed. 1987) Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3d ed., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 50-56; Tallarida et al. (1988) Principles in General Pharmacology, Spring-Verlag, new York, pp. 18-20; e Pat. U.S. Nos. 4657760; 5206344; ou 5225212). De um modo geral, uma

concentração final na gama entre cerca de 0,5 fg/ml e 500 µg/ml inclusive é administrada por dia a um ser humano adulto em qualquer veículo farmacêuticamente aceitável. Ainda, experiências com animais têm proporcionado orientação fiável para a determinação de doses eficazes para terapia humana. O escalonamento interespecies de doses eficazes pode ser realizado seguindo princípios conhecidos na área (e.g., ver, Mordenti e Chapell (1989) "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", em *Toxicokinetics and New Drug Development*; Yacobi, et al., (eds) Pergamon Press, NY).

Doses eficazes podem também ser extrapoladas usando curvas de dose-resposta derivadas de sistemas teste *in vitro* ou com modelos animais. Por exemplo, para anticorpos uma dosagem é tipicamente 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de um peso de corpo recipiente. De preferência, uma dosagem entre 0,1mg/kg e 20 mg/kg de um peso de corpo recipiente, mais de preferência 1 mg/kg a 10 mg/kg de um peso de corpo recipiente. De um modo geral, os anticorpos homo-específicos possuem uma semi-vida maior que os anticorpos hetero-específicos, (e.g., anticorpos humanos duram mais dentro do hospedeiro humano que os anticorpos de uma outra espécie, e.g., como seja um ratinho, provavelmente devido à resposta imune do hospedeiro à composição estranha). Assim, uma dosagem mais baixa de anticorpos humanos e a administração menos frequente é muitas vezes possível se os anticorpos forem administrados a um ser humano. Ainda, a dosagem e frequência de administração de anticorpos do

invento pode ser reduzida através da estimulação da absorção e penetração dos tecidos (e.g., para o cérebro) usando modificações tais como, e.g., lipidificação.

O invento também proporciona uma embalagem farmacêutica ou kit compreendendo um ou mais recipientes cheios com um ou mais dos ingredientes das composições do invento e instruções tais como, e.g., para distribuição (tipicamente, numa forma prescrita por uma agência governamental que regula a produção, utilização ou venda de fármacos ou produtos biológicos).

As quantidades de reagentes necessários para o tratamento eficaz dependerão de muitos factores diferentes, incluindo meios de administração, local alvo, estado fisiológico do doente e outros medicamentos administrados. Assim, as dosagens de tratamento deverão ser tituladas para otimizar a segurança e a eficácia. Tipicamente, as dosagens usadas *in vitro* podem proporcionar uma orientação útil nas quantidades úteis para a administração *in situ* destes reagentes. Os testes em animais de doses eficazes para o tratamento de perturbações particulares proporcionarão mais indicação preditiva da dosagem humana. São descritas várias considerações, e.g., em Gilman, et al., (eds.) (1990) Goodman e Gilman's: The Pharmacological bases of Therapeutics (8th ed.) Pergamon Press; e (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences (17th ed.) Mack Publishing Co., Easton, PA. Os métodos de administração estão aqui discutidos e abaixo, e.g., para administração

oral, intraperitoneal ou intramuscular, difusão transdérmica e outros. Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluirão água, soro fisiológico e outros compostos descritos, e.g., no Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJ. As gamas de dosagem espera-se, naturalmente, que sejam em quantidades inferiores a concentrações de 1 mM, tipicamente inferior a concentrações de cerca de 10 μ M, geralmente menos de aproximadamente 100 nM, de preferência menos de aproximadamente 10 pM (picomolar) e, mais de preferência menos de aproximadamente 1 fM (fentomolar), com um veículo adequado. As formulações de libertação lenta, ou um sistema de libertação lenta serão frequentemente usados para a administração contínua.

As composições de ligação podem ser administradas directamente ao hospedeiro a ser tratado ou, dependendo do tamanho dos compostos, pode ser desejável conjugá-los com proteínas veículo tais como ovalbumina ou albumina sérica antes da sua administração. As formulações terapêuticas podem ser administradas em qualquer formulação de dosagem convencional. Ainda que seja possível para o ingrediente activo ser administrado por si só, é preferível surgir como uma formulação farmacêutica. As formulações tipicamente compreendem pelo menos um ingrediente activo, como aqui definido, juntamente com um ou mais veículos aceitáveis. Cada veículo deverá ser farmacêuticamente e fisiologicamente aceitável no sentido de ser compatível com os outros ingredientes e não prejudicial para o doente. As formulações incluem as adequadas para administração oral,

rectal, nasal ou parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). As formulações podem ser convenientemente apresentadas na forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos conhecidos na área das ciências farmacêuticas. Ver, *e.g.*, Gilman et al., (eds.) (1990) Goodman e Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (8th ed.) Pergamon Press, e (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences (17th ed.) Mack Publishing Co., Easton, PA; Avis, et al., (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY; Lieberman,, et al., (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY; e Liberman, et al., (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NY. O tratamento deste invento pode ser combinado ou usado em associação com outros agentes terapêuticos tais como, *e.g.*, inibidores ACE.

O invento também proporciona uma composição farmacêutica. Tal composição compreende, *e.g.*, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição do invento num veículo farmacêuticamente aceitável. Como aqui usado, o termo "veículo farmacêuticamente aceitável" significa um veículo aprovado por uma agência reguladora federal dos Estados Unidos da América ou uma agência reguladora/administrativa de um governo estatal dos Estados Unidos ou um veículo que está na lista da Farmacopeia dos Estados Unidos ou noutra farmacopeia; o qual é, de um modo geral, reconhecido pelos familiarizados com a área para usar num

animal, e.g., um mamífero, e, mais particularmente, num primata, e.g., um primata humano.

O termo veículo como aqui é usado refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo que é administrado com uma composição do invento. Um veículo farmacêutico tipicamente pode ser um líquido estéril, como seja água ou óleos (incluindo os de petróleo, de origem animal, vegetal ou sintética, e.g., como seja óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de sésamo e similares). Tipicamente, a água estéril é um veículo preferido quando uma composição farmacêutica é administrada intravenosamente. As soluções de soro fisiológico e dextrose aquosa e de glicerol podem ser igualmente empregues como veículos líquidos, particularmente para soluções injectáveis.

Excipientes farmacêuticamente adequados incluem, e.g., sem limites, amido, glucose, lactose, sucrose, gelatina, malte, arroz, farinha, caulino, gel de sílica, estearato de sódio, glicerol monoestearato, talco, cloreto de sódio, leite em pó desnatado, glicerol, propilenoglicol, água, etanol e similares. Uma composição do invento, caso se pretenda, pode também conter pequenas quantidades de agentes molhantes ou emulsionantes, ou agentes tamponantes de pH.

Uma composição do invento pode ser uma solução, suspensão, emulsão, comprimido, pílula, cápsula, pó,

formulação de libertação controlada, etc., ou pode ser formulado como um supositório (com ligantes tradicionais e/ou veículos, e.g., como sejam triglicéridos). Outros exemplos de veículos farmacêuticos adequados estão descritos na última edição de Remington's Pharmaceutical Sciences de E.W. Martin. Tais formulações possuirão uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição do invento, de preferência numa forma purificada, juntamente com uma quantidade adequada de veículo para proporcionar administração adequada a um indivíduo. Tradicionalmente, uma formulação será adequada ao modo de administração.

Numa realização preferida, uma composição é formulada, de acordo com procedimentos de rotina, como uma composição farmacêutica adaptada para administração intravenosa, e.g., a um ser humano. Tipicamente, as composições para administração intravenosa são soluções em tampão aquoso isotónico estéril. Sempre que necessário, a composição pode também incluir, e.g., um agente de solubilização e um anestésico local como a lidocaina para promover o conforto no local de injeção. De um modo geral, os ingredientes são fornecidos separadamente ou misturados numa forma de dosagem unitária, e.g., como um pó liofilizado ou concentrado desidratado num recipiente hermeticamente fechado (como seja uma ampola ou saqueta indicando a quantidade do agente activo). Sempre que a composição se destine a ser administrada por infusão, pode ser distribuída usando um frasco de infusão contendo água ou soro fisiológico estéril de grau farmacêutico. Sempre

que uma composição seja administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou soro fisiológico pode ser proporcionado de forma que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

As composições do invento podem ser formuladas como formas neutras ou de sal. Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem e.g., sem limites, sais aniônicos (tais como os derivados dos ácidos clorídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc.,) e sais catiónicos (e.g., como os derivados de hidróxidos de sódio potássio, amónio, cálcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaina, etc.).

Doenças, perturbações ou alterações fibróticas

Uma composição de ligação, e.g., como seja um anticorpo, é útil no tratamento de condições associadas a doenças fibróticas. A acumulação de componentes da matriz extracelular (ECM) ou a substituição do material celular normal com componentes ECM numa larga variedade de células, tecidos e órgãos pode resultar em fibrose produtora de doença. A fibrose progressiva pode ser fatal, conduzindo a falência terminal de órgãos em múltiplos órgãos, tais como, por exemplo o rim. Dados pré-clínicos e clínicos indicam que TGF Beta 1 é um importante contribuidor para a deposição de proteína da matriz na fibrose intersticial e está envolvido na iniciação e progressão de uma série de estados de doença fibróticos associados, incluindo fibrose

renal crónica (CRD). O grau de fibrose renal está positivamente correlacionada com a progressão para falência renal crónica (CRF, também conhecido como doença renal de fase terminal (ESRD)), que pode resultar em diálise crónica ou transplante renal e morte. TGF-Beta 1 é a citocina mais consistentemente associada experimentalmente e por associação em estudos humanos e animais a tais processos fibróticos.

Os efeitos profundos de TGF-Beta 1 sobre ECM, incluindo o seu papel na estimulação da síntese e inibição da degradação de componentes da matriz extracelular, têm sido alvos de numerosas revisões (ver, e.g., Rocco & Ziyadeh 1991 em *Contemporary Issues in Nephrology* v.23, "Hormones, autococoids and the kidney" Ed. Jay Stein, Churchill Livingston, New York pp.391-410; Roberts et al., 1988 *Rec. Prog. Hormone Res.* 44:157-97). TGF-Beta 1 pode induzir a acumulação de ECM por vias múltiplas e cooperativas, por exemplo, TGF-Beta 1 estimula a expressão de mRNA e a produção de proteína de componentes ECM chave incluindo colagénio tipo I, colagénio tipo IV, fibronectina e laminina (Sharma & Ziyadeh 1997 *Semin Nephrol* 17:80-92). Ao mesmo tempo, TGF-Beta 1 impede a degradação de ECM através da inibição da produção de proteases (tais como, e.g., activador do plasminogénio, collagenase, elastase e estromelisin) que digerem a matriz e através da activação de inibidores de proteases tais como, e.g., inibidores de metaloproteinases tecidulares e inibidores do activador do plasminogénio 1 (Sharma & Ziyadeh 1995 *Kidney Int* 51:S34-

6). TGF-Beta 1 também regula de forma positiva integrinas e receptores da superfície celular para ECM, estimulando assim a capacidade das células interagirem com proteínas ECM específicas (Heino, et al. 1989 J. Biol. Chem. 264:380-8). Ainda, TGF-Beta 1 tem uma propriedade quimiotática potente para atrair células ECM tais como fibroblastos e células fagocíticas (Reibman, et al., 1991 PNAS 88:6805-9). Ainda, TGF-Beta 1 possui uma capacidade peculiar para induzir a sua própria expressão, potencialmente amplificando processos fibróticos aberrantes (Kim, et al., 1990 Mol. Cell. Biol. 10:1492-7).

TGF-Beta 1 está implicado nas seguintes doenças, síndrome e/ou condições:

Doença renal - como seja, e.g., doença renal crônica (CDRD); falência renal crônica (CRF); doença renal de fase terminal (ESRD); glomerulonefrite (GN), incluindo, e.g., GN proliferativa mesangial, GN mesangiocapilar, GN membranosa, GN focal e segmentar, GN imune e GN crescêntica; glomeruloesclerose; nefroesclerose, nefropatia membranosa, nefropatia por imunoglobulina A (IgA); fibrose intersticial renal; esclerose glomerular segmentar focal, fibrose renal em doentes transplantados a receberem ciclosporina; rejeição crônica de transplante renal; nefropatia associada a HIV; hipertrofia das células renais; fibrose tubulointersticial que acompanha doenças renais crônicas, incluindo as resultantes de obstrução das vias urinárias ou nefropatia associada a analgésicos ou após um

episódio de falência renal aguda, como seja falência renal aguda resultante de isquemia renal (Spurgeon et al. Am. J Physiol Renal Physiol 288-F568-F577, 2005); microangiopatia trombótica renal como seja a associada a, e.g., lesão das células endoteliais glomerulares ou outras lesões de células endoteliais microvasculares, como as associadas a pré-eclampsia, endotoxemia e exposição a radiação; vasculite renal; glomerulonefrite necrotizante focal; nefropatia diabética [TGF Beta 1 está associado a CRF através de eventos complexos e diversos que têm impacto na maioria das células do rim (Bottinger, 2002, J. Am. Soci. Nephrol. 13, 2600). Estes eventos resultam em últimas instâncias em fibrose tubulointersticial e glomeruloesclerose conduzindo à perda da função dos nefrônios e finalmente falência renal crônica. Das três isoformas de TGF-Beta, TGF-Beta 1 parece ser predominante na mediação da progressão de doença renal crônica, não só por ser a isoforma mais predominante como também devido a TGF-Beta 2 e Beta 3 parecerem mediar os seus efeitos através da regulação positiva da expressão TGF-Beta 1 (Yu, 2003 Kid. Int. 64:844). Tanto estudos *in vitro* como *in vivo* implicam TGF-Beta 1 na patogênese de doença renal diabética incluindo complicações associadas a diabetes mellitus tipo 1 ou tipo 2, como seja, e.g., glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial (Ziyadeh 1998 Cur. Pract. Med. 1:87-9). O anti-soro contra TGF é eficaz no tratamento de glomerulonefrite (Border et al. 1990 Nature 346:371-4)]; doença renal fibrótica [TGF-Beta 1 medeia a hipertrofia celular renal, uma outra característica de nefropatia diabética através da interferência

com a regulação normal do ciclo celular através da indução de inibidores das cinases dependentes de ciclina, tais como p27Kip1 e p21Cip1 (Wolf & Ziyadeh 1999 *Kidney Int.* 56:393-405). Estes inibidores também são aumentados por glucose elevada e pelo estado diabético (Wolf, et al. 2001 *Am. J. Pathol.*; 158:1091-1100; Wolf, et al. 1999 *Diabetologia* 42:1425-32; Wolf et al., 1997 *Am. J. Physiol.* 273:F348-56). Eles suprimem a actividade de cinases dependentes de ciclina, predominantemente a cinase dependente de ciclina 2 (cinase de ciclina E (Liu & Preisig 1999 *Am. J. Physiol.* 277:F186-94), e assim a inibição de fosforilação da proteína do retinoblastoma e a paragem do ciclo celular na fase G1 tardia. A célula entra num período de síntese proteica sem replicação do DNA e sofre hipertrofia. Assim, TGF-Beta causa alterações ao nível celular que se traduzem nas características patofisiológicas de nefropatia diabética]; nefropatia diabética experimental; nefroesclerose hipertensiva [Uma vez que as propriedades estruturais e de filtração do glomérulo são largamente determinadas pela composição da matriz extracelular do mesângio e da membrana glomerular, não é surpreendente que TGF-Beta 1 tenha efeitos profundos no rim. TGF-Beta 1 medeia as alterações patológicas de doença renal diabética (Ziyadeh 1998 *Curr. Prac. Med.* 1:87-89). A acumulação de matriz mesangial em glomerulonefrite proliferativa (Border et al. 1990 *Kidney Int.* 37:689-695) e nefropatia diabética (Mauer et al. (1984) *J. Clin. Invest.* 74:1143-1155) são características patológicas claras e dominantes das doenças. Os níveis de TGF-Beta 1 são elevados em glomeruloesclerose (nefropatia

avançada) (Yamamoto et al. 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1814-1818). Também se encontrou que TGF-Beta 1 é um mediador importante na gênese de fibrose renal numa série de modelos animais (Phan, et al. 1990 Kidney Int. 37:426; Okuda et al. 1990 J. Clin. Invest. 86:453). Foi demonstrado a supressão de glomerulonefrite induzida experimentalmente em ratos usando anti-soro contra TGF-Beta (Border et al. 1990 Nature 346:371) e contra uma proteína da matriz extracelular, decorina, a qual se pode ligar a TGF-beta 1 (Border, et al. 1992 Nature 360:361-363; ver também e.g., Border & Noble 1994 N. Engl. J. Med. 331:1286-92; Border, et al. 1989 Semin. Nephrol. 9:307-17; Han et al. 2000 Am J Physiol 278:F628-34; e Ziyadeh et al. 2000 PNAS 97 :8015-20)]. Consequentemente, uma composição de ligação do invento será útil no tratamento, melhoria, modulação, diagnóstico e/ou inibição de uma doença, perturbação, síndrome e/ou condição como atrás descrito.

Doença hepática - como seja, e.g., cirrose; fibrose hepática; [A fibrose hepática é uma resposta comum à necrose ou lesão hepatocelular, a qual pode ser induzida por uma grande variedade de agentes, e.g., qualquer processo que altera a homeostasia (especialmente a inflamação, lesão tóxica ou fluxo sanguíneo hepático alterado) e infecções do fígado (virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias). Numerosas alterações das reservas resultantes de erros congénitos do metabolismo estão muitas vezes associados a fibrose, incluindo as anormalidades de lípidos (doença de Gaucher); doenças associadas às reservas

de glicogénio (especialmente tipos III, IV, VI, IX e X); deficiência em 1-antitripsina; reservas de substâncias exógenas, conforme observado em síndromes de excesso de ferro (hemocromatose) e doenças de reservas de cobre (doença de Wilson); acumulação de metabolitos tóxicos (como em tirosinemia, fructosemia e galactosemia); e alterações dos peroxissomas (síndrome de Zellweger). Numerosos compostos químicos e fármacos causam fibrose, especialmente álcool, metotrexato, isoniazida, oxifenisatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida e amiodarona. Alterações da circulação hepática (e.g., falência cardíaca crónica, síndrome de Budd-Chiari, doença veno-oclusiva, trombose da veia porta) e obstrução crónica do fluxo biliar podem conduzir a fibrose. Por fim, a fibrose hepática congénita é uma malformação recessiva autossómica.

A maioria das pessoas a nível mundial possui hepatite viral crónica ou esteato-hepatite associada a álcool ou a obesidade, mas outros insultos indutores de fibrose incluem, por exemplo, parasitoses (e.g., esquistossomose), ataque auto-imune aos hepatócitos ou ao epitélio biliar, doença hepática neonatal, perturbações metabólicas incluindo hemocromatose e uma variedade de doenças de reservas, condições inflamatórias crónicas (e.g. sarcoidose), toxicidade de fármacos (e.g. metotrexato ou hipervitaminose A) e desarranjos vasculares, congénitos ou adquiridos.

As células esteladas hepáticas (HSC) são uma

fonte celular importante de ECM na fibrose hepática (Li & Friedman 1999 J. Gastroenterol. Hepatol. 14:618-33). As HSC estão localizadas no espaço peri-sinosoidal de Disse, o qual separa os hepatócitos do endotélio sinusoidal. Os insultos hepáticos, como descrito, activam HSC normalmente quiescentes conduzindo à sua subsequente proliferação e activação. As HSC activadas sofrem uma transdiferenciação fenotípica subsequente para miofibroblastos contrácteis (MFB), os quais expressam actina do músculo liso e um excesso de moléculas ECM observadas na fibrose hepática. A transdiferenciação de HSC em MFB é devido à expressão excessiva de TGF- β 1 no seu papel como regulador chave da resposta fibrótica do fígado ao stress e lesão (Gressner et al. 2002 Front. Biosci. 7:d793-807). TGF- β 1 é o indutor mais forte conhecido da fibrinogénese nas células efectoras de fibrose hepática (Schuppan, et al., 2003 Cell Death Differ. 10 Supl 1:S59-67). Assim, os níveis de TGF- β 1 nos tecidos e no soro são elevados na fibrose hepática e a expressão excessiva de TGF- β 1 em ratinhos transgénicos e a administração de TGF- β 1 demonstraram induzir fibrose de órgãos (Kanzler, et al. 1999 Am. J. Physiol. 276:G1059-68; Sanderson, et al. 1995 PNAS 2572-76). Ainda, a fibrose experimental pode ser inibida por tratamentos anti-TGF- β 1, e.g. com anticorpos neutralizantes ou receptores de TGF solúveis (George et al. 1999 PNAS 12719-24; Qi et al. 1999 PNAS 2345-49). A expressão de TGF- β observada de HSC/MFB activadas, a potência de TGF- β 1 para regular positivamente a expressão de ECM e a expressão dos receptores de TGF em HSC conduziu a um modelo largamente aceite em que a

estimulação persistente auto/parácrina de HSC/MFB activadas por TGF- β 1 é a resposta fibrogénica chave na promoção da fibrose de órgãos. Consequentemente, prevê-se que a redução em TGF- β 1 reduza a fibrogénese hepática (Wu & Zern 2000 J. Gastroenterol. 35:665-72)];

Doença do pulmão - como seja, e.g.: fibrose pulmonar (Giri et al. Thorax 48, 959-966, 1993); fibrose pulmonar idiopática; síndrome de distrofia respiratória adulta; pneumonia de organização criptogénica, bronquiolite obliterante (BO), bronquiolite obliterante (associada a transplante); doença do pulmão induzida por fármacos; doença do pulmão induzida por irradiação; fibrose localizada à volta das vias aéreas em asma e enfisema; pneumonite devida a hipersensibilidade; pneumonia de organização criptogénica (COP); doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD); pneumonite intersticial aguda (AIP); asbestose; fibrose pulmonar intersticial associada a perturbações autoimunes, tais como lúpus sistémico eritematoso e escleroderma, contacto químico ou alergias; asma; doença pulmonar crónica do recém-nascido (CLD) [A expressão desregulada de TGF- β 1 desempenha um papel importante na patogénese do desenvolvimento aberrante das vias respiratórias numa série de doenças crónicas do pulmão incluindo asma, fibrose pulmonar e doença pulmonar crónica do recém-nascido (CLD) (Holgate, et al. 2001 Int. Arch. Allergy Immunol. 124:1-3:253-8; Khalil, et al. 2001 Thorax 56 12:907-15; Lecart et al. 2000 Biol. Neonate 774:217-23; pulleyn et al., 2001 Hum. Genet. 109 6:623-7; Sagara et al.

2002 J. Allergy Clin. Immunol. 110 2:249-54; Sheppard 2001 Chest 120 1 Suppl:49S-53S; Strieter, 2001 Chest 120 1 Suppl:77S-85S; Toti et al. 1997 Pediatr. Pulmonol. 24 1:22-8). A expressão excessiva de TGF- β 1 activo nas superfícies alveolares de ratinho conduz a uma resposta fibrótica vigorosa e a inibição de TGF- β 1 por anticorpos ou iscas inibe a fibrose induzida por bleomicina (Kelly et al. 2003 Cur. Pharm. Des. 9:3949). Ainda, a análise de microarranjos de mRNA pulmonar total mostra que a maior parte dos genes induzidos por TGF- β 1 conhecidos são regulados de forma positiva durante a fibrose induzida experimentalmente (Kaminski et al. 2000 PNAS 97:1778-83)];

Doença cardiovascular - aterosclerose; [TGF- β está associado a aterosclerose (ver e.g., T.A. McCaffrey: 2000 "TGF- β s and TGF- β Receptors in Atherosclerosis" Cytokine and Growth factor Review 11:103-114)]; crescimento cardíaco hipertrófico (Schultz, et al. 2002 J. Clin. Invest. 109 (6):787-96; Brand & Schneider 1995 J. Mol. Cell Cardiol. 27:518); esclerose sistémica progressiva [em paralelo com o aumento dos níveis de TGF- β 1 na vasculatura envelhecida estão os aumentos marcados nos níveis de fibronectina (Li et al. 1999). Estas alterações indubitavelmente contribuem para a mudança de um vaso elástico para um vaso fibrótico/rígido]; fibrose microvascular induzida mecanicamente; sarcoidose; fibrose ventricular; doença cardíaca isquémica induzida por radiação [um risco de morte significativamente superior de morte devido a doença cardíaca isquémica foi descrito para

doentes tratados com radiação para a doença de Hodgkin e cancro da mama. Determinadas citocinas e factores de crescimento, tais como TGF- β 1, podem estimular a proliferação endotelial induzida por radiação, proliferação de fibroblastos, depósito de colagénio e fibrose conduzindo a lesões avançadas de aterosclerose]; lesão arterial (Wolf et al. 1994 J. Clin. Invest. 93, 1172-8); insuficiência venosa crónica (CVI); lesão restenótica após angioplastia coronária transluminal percutânea (PCA) ou colocação de "stent"; síndrome de Hermansky-Pudlak; polimiosite; escleroderma; dermatomiosite; fascite eosinofílica; morfeia ou as lesões associadas à ocorrência da síndrome de Raynaud; fibrose perivascular de vasculatura coronária intramural do miocárdio sem enfarte; hiperplasias induzidas por lesões tais como, e.g. restenose; fibrose de aterosclerose com doença vascular por colagénio [TGF- β 1 pode ser um factor no espessamento progressivo da parede arterial que resulta da proliferação de células do músculo liso e depósito de matriz extracelular na artéria após angioplastia com balão. O diâmetro da artéria restenosada pode ser reduzido em 90% por este espessamento e, uma vez que a maioria da redução do diâmetro é devida à matriz extracelular e não aos corpos das células do músculo liso, pode ser possível abrir estes vasos até 50% simplesmente através da redução do extenso depósito da matriz extracelular. Nas artérias de porcos não lesionadas transfectadas *in vivo* com um gene TGF- β 1, a expressão do gene TGF- β 1 foi associada à síntese da matriz extracelular e hiperplasia (Nabel et al. 1993 PNAS 90:10759-63)]; histiocitose X (granuloma eosinofílico);

Fibrose dos tecidos moles - (Border & Ruoslahti 1992 J. Clin. Inv. 90:1-7; Border & Noble 1994 N. Engl. J. Med. 331:1286-91); disfunção erétil (Moreland R. 1998 Int. J. Impot. Res. 10:113-20); artrite reumatóide (Wahl et al. 1993 J. Exp. Medicine 177, 225-30);

Cicatrização de feridas - feridas da derme; lesões de queimaduras; cicatrização hipertrófica; formação de quelóides; cicatrização da conjuntiva (Cordeiro MF, 2003 Clin. Sci. (Lond). 104(2):181-7)[O tratamento de feridas fetais com diferentes concentrações de TGF- β 1 causou cicatrização marcada destas feridas, mostrando um envolvimento directo de TGF- β 1 em cicatrização cutânea (Sullivan, et al., 1995 J Pediatr Surg 30:198-203). Foi demonstrado que anticorpos neutralizantes contra TGF- β 1 injectados nas margens das feridas em cicatrização em ratos inibem a cicatrização sem interferir com a velocidade de cicatrização das feridas ou com a força tensora da ferida. Ao mesmo tempo, houve redução da angiogénese, redução do número de macrófagos e monócitos na ferida e uma redução da quantidade de deposição desorganizada de fibras de colagénio no tecido da cicatriz (Shah, et al., 1992 Lancet 339:213-4; Shah et al., 1994 J. Cell Science 107:1137-57; Shah et al. 1995 J. Cell Sci. 108:985-1002). A redução da resposta de cicatrização em feridas de ratinhos tratadas topicamente com ácido nucleico complementar da cadeia codificante de TGF- β 1 (Choi et al., 1996 Immunol. Cell Biol. 74:144-50). A aplicação tópica de um antagonista

sintético de TGF- β 1 reduziu a cicatrização em queimaduras de suínos e em feridas de excisão, assim como em excisões da pele de coelho (Huang et al. 2002 FASEB J. 16:1269-70; Werner & Grose 2003 Physiol. Rev. 83(3):835-70)];

Doença inflamatória - doença inflamatória do intestino (IBD) como seja, e.g., doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC) [a inflamação intestinal depende do equilíbrio entre citocinas inflamatórias, especialmente da actividade de IFN- γ e de TGF- β 1 (Strober et al., 1997 Immunol. Today 18:61-4; Neurath et al., 1996 J. Exp. Med. 183, 2605-16; Ludviksson et al., 1997 J. Immunol. 159; Boirivant et al., 1998 J. Exp. Med. 188, 1929-39; Powrie et al., 1996 J. Exp. Med. 2669-74). A lesão de tecidos, mediada por resposta imune no tubo digestivo está associada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais activam o factor de transcrição NF kappa-B numa variedade de tipos celulares diferentes]; artrite reumatóide (RA); hiperplasia sinovial [TGF- β 1 está elevado no fluido sinovial de artrite reumatóide humana (Lotz et al. 1990 J. Immunol. 144:4189-94). TGF- β 1 em excesso forma excrescências dolorosas das ligações ósseas designadas osteófitos (van Beuningen, et al. 1994 Lab. Invest. 71:279-90), hiperplasia sinovial e inflamação em RA (Hamilton et al. 1991 PNAS 88:7180-4). A inibição de TGF- β 1 endógeno num modelo de artrite murina resulta na prevenção da formação de osteófitos e inibe a reparação de cartilagem, sugerindo o seu papel nestes eventos patológicos (Scharstuhl et al. 2002 Immunol. 169:507-14)];

Doenças de proliferação celular - Numerosos dados demonstram que TGF- β 1 não só possui potencial transformante, como também pode dirigir a progressão, invasão e metástases malignas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Derynck et al. 2001 Nat. Genet. 29:117-29; Cui et al., 1996 Cell 86:531-42). Exemplos de estados, doenças, perturbações, síndromes e/ou condições hiperproliferativos incluem, e.g., sem limites, uma neoplasia do cólon, abdómen, osso, mama, sistema digestivo, fígado, pâncreas, peritонеu, sistema endócrino (e.g., uma glândula supra-renal, uma glândula paratiróide, a pituitária, os testículos, o ovário, o timo ou a tiróide), olho, cabeça, pescoço, sistema nervoso (central ou periférico), o sistema linfático, pélvis, pele, baço, tórax e sistema urogenital. De forma semelhante, outras condições hiperproliferativas incluem, e.g., sem limites hipergamaglobulinemia, condições linfoproliferativas, paraproteinemias, púrpura, sarcoidose, Hamartoma, Síndrome de Sezary, macroglobulinemia de Waldenström, síndrome da doença de Gaucher, histiocitose e outros estados hiperproliferativos.

Apesar da actividade supressora de tumores de TGF- β 1, as células tumorais frequentemente apresentam produção aumentada deste factor de crescimento (Derynck, et al. 1987 Cancer Res. 47:707-12; Dickson, et al. 1987 PNAS 84:837-41) e considerável evidência documenta o seu papel promotor de tumores através dos seus efeitos na invasão de células tumorais e alterações no microambiente do tumor. É

agora claro que TGF- β 1 pode actuar como um supressor de tumor e como um estimulador importante da progressão, invasão e metástases de tumores. Nas fases precoces da tumorigénese, como seja quando o tumor ainda é benigno, TGF- β actua directamente na célula de cancro para suprimir o crescimento excessivo do tumor. À medida que o tumor progride, no entanto, alterações genéticas e/ou bioquímicas permitem que TGF- β 1 estimule a progressão de tumores pelas suas actividades pleiotrópicas nas células tumorais *per se* e nos tipos celulares estromáticos não malignos do tumor. A estimulação da invasão e das metástases por TGF- β 1 deverá ser de maior consequência clínica que o seu papel supressor de tumores, uma vez que a maioria dos tumores humanos mantém uma via de sinalização de TGF- β funcional (Akhurst & Derynck 2001 Trends Cell Biol. 11:S44-51).

Existe uma substancial quantidade de evidência de que a produção excessiva de TGF- β 1 nas doenças proliferativas celulares está associada a mau prognóstico (Tsushima *et al.*, 1996 Gastroenterology 110:375-82; Adler *et al.* 1999 J. Urol. 161:182-7). Existem vários tipos de cancro em que TGF- β 1 produzido pelo tumor pode ser prejudicial. As células de cancro da próstata de rato MATLyLu (Steiner & Barrack 1992 Mol. Endocrinol. 6:15-25) e as células de cancro da mama humana (Arteaga, *et al.* 1993 Cell Growth and Differ. 4:193-201) tornam-se mais tumorigénicas e metastáticas após transfecção com um vector que expressa TGF- β 1 de ratinho. TGF- β 1 está associado a angiogénese, metástases e maus prognósticos na próstata

humana e em cancro gástrico avançado (Wikstrom P., *et al.* (1998) *Prostate* 37:19-29; Saito H *et al.* (1999) *Cancer* 86:1455-62). No cancro da mama, o mau prognóstico está associado a TGF- β 1 elevado (Dickson *et al.* 1987 *PNAS* 84:837-41; Kasid *et al.* 1987; *Cancer Res.* 47:5733-8; Daly *et al.* 1990 *J. Cell Biochem.* 43:199-211; Barrett-Lee, *et al.* 1990 *Br. J. Cancer* 61:612-7; King *et al.*, 1989 *J. Steroid Biochem.* 34:133-8; Welch, *et al.* 1990 *PNAS* 87:7678-82; Walker *et al.* 1992 *Eur. J. Cancer* 238:641-4) e indução de TGF- β 1 por tratamento com tamoxifeno (Butta, *et al.* 1992 *Cancer Res.* 52:4261-4) está associado à falência do tratamento com tamoxifeno para cancro da mama (Thompson *et al.* 1991 *Br. J. Cancer* 63:609-14). Os anticorpos anti-TGF- β 1 inibem o crescimento das células do cancro da mama humanas MDA-231 em ratinhos atímicos (Arteaga, *et al.* 1993 *J. Clin. Invest.* 92:2569-76), um tratamento que está correlacionado com um aumento na actividade de células assassinas naturais do baço. Células CHO transfectadas com TGF- β 1 latente também mostraram decréscimo na actividade NK e aumento do crescimento de tumores em ratinhos labro (Wallick *et al.* 1990 *J. Exp. Med.* 172:1777-84). Assim, TGF- β 1 secretado pelos tumores da mama pode causar uma supressão imune endócrina. Concentrações elevadas no plasma de TGF- β 1 indicam mau prognóstico para os doentes com cancro da mama avançado (Anscher *et al.* 1993 *N. Engl. J. Med.* 328:1592-8). Os doentes com nível elevado de TGF- β 1 circulante antes da quimioterapia com doses elevadas e transplante de medula óssea autóloga estão em risco elevado para doença hepática veno-oclusiva (15-50% de todos os

doentes com uma taxa de mortalidade até 50%) e pneumonite idiopática intersticial (40-60% de todos os doentes). As implicações destes resultados são que níveis elevados de TGF- β 1 no plasma podem identificar doentes em risco e que a redução de TGF- β 1 poderá baixar a morbilidade e a mortalidade destes tratamentos em doentes com cancro da mama.

Muitas células malignas secretam TGF- β 1, sugerindo que a produção de TGF- β 1 pode proporcionar um mecanismo de escape das células tumorais à vigilância imune do hospedeiro. O estabelecimento de uma sub-população de leucócitos com sinalização de TGF- β 1 destruída no hospedeiro portador de tumor oferece um meio potencial para imunoterapia do cancro. Um modelo de animal transgénico com sinalização de TGF- β 1 destruída nas células T é capaz de erradicar um tumor tipo linfoma que expresse excessivamente TGF- β 1, o qual normalmente seria letal, EL4 (Gorelik & Flavell, 2001 *Nature Medicine* 7(10):1118-22). A regulação negativa da secreção de TGF- β 1 em células tumorais resulta no restauro de imunogenicidade no hospedeiro, enquanto a insensibilidade de células T a TGF- β 1 resulta em diferenciação acelerada e autoimunidade, elementos dos quais podem ser necessários para combater tumores que expressem auto-antígenos num hospedeiro tolerizado. Os efeitos imuno-supressores de TGF- β 1 também foram implicados numa subpopulação de doentes com HIV com resposta imune inferior ao previsto baseado nas suas contagens de células T CD4/CD8 (Garba et al. 2002 *J. Immunology* 168:2247-54). Um

anticorpo neutralizante de TGF- β 1 foi capaz de reverter o efeito em cultura, indicando que outros inibidores anticorpos contra TGF- β 1 poderão ter utilidade na reversão da supressão imune presente nesta subsérie de doentes com HIV.

O duplo papel de supressão/promoção de tumores de TGF- β 1 está claramente elucidado num sistema transgénico com expressão excessiva de TGF- β 1 em queratinócitos. Apesar dos transgénicos serem mais resistentes à formação de lesões benignas da pele, a taxa de conversão metástica em transgénicos foi dramaticamente diminuída (Cui et al. 1996 Cell 86(4):531-42). A produção de TGF- β 1 por células malignas em tumores primários aumenta com os estados avançados da progressão de tumores. Estudos realizados em muitos dos principais cancros epiteliais humanos sugerem que o aumento da produção de TGF- β 1 pelos cancros humanos ocorre como um acontecimento relativamente tardio durante a progressão de tumores. Ainda, TGF- β 1 associado a tumores proporciona células tumorais com uma vantagem selectiva e promove a progressão de tumores. Os efeitos de TGF- β 1 nas interacções célula/célula e célula/estroma resultam numa maior propensão para a invasão e metástases. TGF- β 1 associado a tumores pode permitir que as células tumorais escapem à vigilância imune uma vez que é um inibidor forte da expansão clonal de linfócitos activados, como observado por exemplo em doentes com tumores agressivos do cérebro ou da mama (Arteaga et al., 1993 J. Clin. Invest. 92:2569-76). TGF- β 1 inibe a produção de angiostatina. As modalidades

terapêuticas do cancro, tais como a terapia com radiação e a quimioterapia, induzem a produção de TGF- β 1 activado no tumor, seleccionando assim o crescimento excessivo de células malignas resistentes aos efeitos inibidores do crescimento de TGF- β 1. Assim, estes tratamentos anticancro aumentam o risco e aceleram o desenvolvimento da malignidade do tumor. Os agentes que previnem a transdução de sinal mediada por TGF- β 1 poderão ser uma estratégia terapêutica muito eficaz em tais situações. A resistência das células tumorais a TGF- β 1 anula muitos dos efeitos citotóxicos da terapia com radiação e da quimioterapia e a activação de TGF- β 1 no estroma dependente do tratamento pode mesmo ser prejudicial uma vez que pode tornar o microambiente mais conducente à progressão dos tumores e contribuir para a destruição de tecidos, conduzindo à fibrose. As células de cancro da próstata expressam níveis elevados de TGF- β 1, os quais parecem aumentar o crescimento de cancro da próstata e metástases através da estimulação da angiogénese e através da inibição das respostas imunes dirigidas contra células tumorais. As células de cancro da próstata frequentemente perdem os seus receptores de TGF- β 1 e adquirem resistência aos efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos de TGF- β 1. Assim, a expressão elevada de TGF- β 1 e a perda da expressão do receptor de TGF- β 1 têm sido associadas a um prognóstico particularmente mau em doentes com cancro da próstata humano (Wikstrom, *et al.* 2000 Scand. J. Urol. Nephrol. 34(2):85-94). No carcinoma hepatocelular (HCC), a indução da expressão de TGF- β 1 com concomitante perda da expressão do receptor de TGF- β 1 em

focos e nódulos do fígado faz com que hepatócitos alterados escapem da apoptose induzida por TGF- β 1, proporcionando assim aos hepatócitos alterados vantagem no crescimento durante a hepatocarcinogénese (Lim 2003 Mech. Ageing Dev. 124(5):697-708). Nos carcinomas das células escamosas da cabeça e pescoço, a expressão excessiva de TGF- β 1 nas fases iniciais proporciona um microambiente para a promoção do tumor (Lu, et al. 2004 Cancer Res. 64(13):4405-10); uma composição de ligação pode ser usada para modular, melhorar, tratar, prevenir e/ou diagnosticar uma doença, condição, perturbação ou síndrome hiperproliferativa (como seja uma neoplasia) através de interacções directas ou indirectas. Por exemplo, através da prevenção da inibição da proliferação de células que, por sua vez, modulam um estado hiperproliferativo (e.g., TGF Beta 1 inibe a proliferação e a diferenciação funcional de linfócitos T, células assassinas activadas por linfocinas, células NK, neutrófilos, macrófagos e células B (Letterio & Roberts 1998 "Regulation of the immune response by TGF Beta" Ann. Rev. Immunol. 16:137-61) ou através do aumento de uma resposta imune (e.g., através do aumento da antigenicidade de uma proteína envolvida numa condição hiperproliferativa); ou causando a proliferação, diferenciação ou mobilização de um tipo celular específico (e.g., uma célula T). Um efeito pretendido usando uma composição do invento pode também ser conseguido através de, e.g., aumento de uma resposta imune existente ou iniciando uma nova resposta imune. Como alternativa, o resultado pretendido pode ser afectado por, e.g., diminuição ou bloqueio de uma resposta

imune existente ou através da prevenção da iniciação de uma nova resposta imune. A administração local a uma célula com proliferação anormal pode ser conseguida por qualquer método conhecido na área ou técnica aqui discutida incluindo, e.g., sem limites transfecção, electroporação, microinjecção de células ou em veículos (tais como um lipossoma, lipofectina ou um polinucleótido nu). Por "condição proliferativa celular" pretende-se significar qualquer doença, síndrome, perturbação, condição ou estado humano ou animal que afecte qualquer célula, tecido, qualquer local ou qualquer combinação de órgãos, tecidos ou partes do corpo, a qual se caracteriza por uma proliferação anormal isolada ou multifocal de células, grupos de células ou tecidos, benigna ou maligna.];

Doença neuronal - cicatrização neuronal (Logan et al. 1994 Eur. J. Neurosci. 6 :355-63) ; anormalidades cerebrovasculares ; doença de Alzheimer (Masliah et al. 2001 Neurochemistry International 39:393-400 [os níveis de mRNA de TGF- β 1 no giro frontal médio estão positivamente correlacionados com o grau relativo de deposição amilóide cerebrovascular nessa região do cérebro, sugerindo um possível papel para TGF- β 1 em anormalidades cerebrovasculares humanas. Os ratinhos transgénicos que expressam em excesso TGF- β 1 em astrócitos desenvolvem anormalidades cerebrovasculares tipo doença de Alzheimer (AD), incluindo astrocitose perivascular, espessamento da membrana basal microvascular e acumulação de amilóide positiva para tioflavina S na ausência de degeneração do parênquima. A

produção excessiva crónica de TGF- β 1 no cérebro resulta em problemas estruturais e funcionais reminiscentes dos casos de AD com angiopatia amilóide (Buckwalter et al., 2002 Ann. N. Y. Acad. Sci. 977:87-95]; retinopatia proliferativa (Chaturvedi et al., 2002 Diabetes Care 25:2320-7)); outras doenças do olho associadas a uma condição fibroproliferativa associada à produção excessiva de TGF- β 1 incluem cirurgia de colagem da retina que acompanha a vítreo-retinopatia; extracção de cataratas com implante de lente intra-ocular; e cirurgia pós-drenagem de glaucoma;

Estados/condições hemopoiéticos -[O equilíbrio natural entre estimuladores e inibidores endógenos da angiogénese é aquele em que tipicamente predominam as influências inibidoras (ver, e.g., Rastinejad et al., Cell 56345-355 (1989)). Quando a neovascularização ocorre em condições fisiológicas normais, como sejam a cicatrização de feridas, a regeneração de órgãos, o desenvolvimento embrionário e os processos reprodutores nas fêmeas, a angiogénese é estritamente regulada e delimitada espacialmente e temporalmente. Na angiogénese patológica como seja, e.g. durante a formação de tumores sólidos, estes controlos reguladores falham e a angiogénese desregulada pode tornar-se patológica através da progressão sustentada de muitas doenças neoplásicas e não neoplásicas. Uma série de doenças graves são dominadas por neovascularização anormal (incluindo, e.g., crescimento e metástases de tumores sólidos, artrite, alguns tipos de condições do olho e psoríase; ver, e.g., revisões por

Moseset *al.*, 1991 Biotech. 9630-634; Folkman *et al.*, 1995 N. Engl. J. Med., 333:1757-63; Auerbach *et al.*, 1985 J. Microvasc. Res. 29:401-11; Folkman, "Advances in Cancer Research", Eds. Klein and Weinhouse, Academic Press, New York, pp. 175-203 (1985); Patz, 1982 Am. J. Ophthalmol. 94:715-43; e Folkman *et al.*, 1983 Science 221:719-25. A angiogénese tumoral é crucial para o crescimento e invasão de tumores, uma vez que os vasos sanguíneos libertam nutrientes e oxigénio às células tumorais e permite-lhes intravasar o sistema sanguíneo, o que leva a metástases. TGF-Beta 1 actua como um potente indutor de angiogénese em vários ensaios (Roberts *et al.* 1986 PNAS 83:4167-71; Madri *et al.* 1988 J. Cell. Biol. 106:1375-84; Yang & Moses 1990 J. Cell Biol. 111:731-74; Gajdusek *et al.*, 1993 J. Cell. Physiol. 157:133-44; Choi & Ballermann 1995 J. Biol. Chem. 270:21144-50) e modelos de ratinho defectivos nos componentes de sinalização por TGF indicam a importância de TGF1 no desenvolvimento normal da vasculatura. Ainda, TGF Beta 1 e os seus receptores ALK-5 e ALK-1 estão implicados na fase de maturação vascular da angiogénese (ver, *e.g.*, Bull. Acad. Natl. Med. 2000; 184 (3):537-44). Numa série de condições patológicas, a angiogénese contribui para um estado de doença, *e.g.*, por exemplo, dados significativos foram-se acumulando sugerindo que a formação de tumores sólidos está dependente de angiogénese (ver, *e.g.*, Folkman & Klagsbrun 1987 Science 235:442-7). Numa outra realização do invento, a administração de uma composição de ligação proporciona o tratamento, melhoria, modulação, diagnóstico e/ou inibição de uma doença, perturbação, síndrome e/ou

condição associada a neovascularização ou à expansão de células hematopoiéticas. As condições malignas e metásticas que podem ser efectuadas numa determinada forma usando uma composição de ligação incluem, e.g., sem limites, uma doença maligna, tumor sólido e cancro como aqui descrito ou como conhecido na área (para uma revisão de tais perturbações, síndromes, etc., ver e.g., Fishman et al., Medicine, Current Ed. J. B. Lippincott Col., Philadelphia 2002). Por exemplo, os cancros que podem também ser afectados usando uma composição do invento incluem, e.g., sem limites, um tumor sólido, incluindo e.g., cancro da próstata, pulmão, mama, ovário, estômago, pâncreas, laringe, esófago, testículos, fígado, parótidas, trato biliar, cólon, recto, cérvix, útero, endométrio, rim, bexiga e tiróide; tumores primários e metástases; melanomas; glioblastoma; sarcoma de Kaposi; leiomiossarcoma; cancro das células não pequenas do pulmão; cancro colo-rectal; cancros avançado; e tumores do sangue tais como, e.g., leucemia;

Infecções - sépsis; [o curso da infecção por leishmanias em ratinhos é drasticamente alterada por TGF- β 1. Ratinhos geneticamente resistentes tornam-se susceptíveis à infecção por leishmania quando da administração de TGF- β 1. TGF- β 1 exacerba a doença, enquanto os anticorpos contra TGF- β 1 param a progressão da doença (Barral-Netto, et al. 1992 Science 257:545-7)];

Perda de cabelo - alopecia; perda de cabelo [um

anticorpo anti-TGF- β 1 reverteu a inibição do crescimento de queratinócitos induzida por androgénios numa forma dependente da dose sugerindo que o TGF- β 1 induzido por androgénios, derivado de células de papilas dérmicas calvas, medeia a supressão do crescimento do cabelo em alopecia androgénica e assim pode ter um papel na calvície humana (Inui, et al. 2002 FASEB J. 16(14):1967-9)]; assim, o invento proporciona um método de melhorar, modular, tratar, prevenir e/ou diagnosticar uma doença e/ou perturbação relacionada com angiogénese, compreendendo a administração a um indivíduo necessitado de uma quantidade eficaz de uma composição de ligação.

O âmbito lato deste invento é melhor entendido com referência aos exemplos que se seguem, os quais não se destinam a limitar o invento a realizações específicas.

EXEMPLOS

Métodos gerais

Muitos dos métodos convencionais aqui descritos estão descritos ou referenciados, e.g., em Sambrook, et al. (2001) Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; e no seu local da rede associado; (www.MolecularCloning.com); Ausubel, et al., Biology Greene Publishing Associates, Brooklin, NY; ou Ausubel, et al. (1987 e Suplementos) Current Protocols in Molecular Biology Wiley/Greene, NY;

Brtlett & Stirling (2003) PCR Protocols: Methods in Molecular Biology Vol. 226 Humana Press, NJ. Os métodos de purificação de proteínas incluem métodos tais como precipitação com sulfato de amónio, cromatografia em coluna, electroforese, centrifugação, cristalização e outros; ver, e.g., Ausubel et al. (1987 e suplementos periódicos); Deutscher (1990) "Guide to proteína Purification", Methods in Enzymology vol. 182 e outros volumes nesta série: Coligan et al. (1995 and suplementos) Current Protocols in Protein Science John Wiley and Sons, New York, NY; Matsudaira (ed.) (1993) A Pratical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA; e literatura do fabricante quando da utilização dos produtos de purificação de proteínas, e.g., Pharmacia, piscataway, NJ, ou Bio-Rad, Richmond, CA. A combinação com técnicas recombinantes permite a fusão a segmentos adequados (marcas de epitopos), e.g., a uma sequência FLAG ou a um equivalente que pode ser fundido, e.g., via uma sequência removível por proteases. Ver, e.g., Hochuli (1989) Chemische Industrie 12:69-70; Hochuli (1990) "Purification of recombinant Proteins with Metal Chelate Absorvent" in Setlow (ed.) Genetic Engineering, Principle and Methods 12:87-98, Plenum Press, NY; e Crowe et al. (1992) QIAexpress: The High Level Expression and Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA).

Técnicas imunológicas convencionais estão descritas, e.g., em Hartzenberg, et al. (eds) 5ª ed. 1996

Weir's Handbook of Experimental Immunology vols. 1-4, Blackwell, Science; Bierer, et al., Eds. (2004) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; e Methods in Enzymology volumes:70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162 e 163 Elsevier, USA.

Exemplo 1: Construção e rastreo de fragmentos Fab usando CDRs e regiões estruturais humanas

Foram usadas abordagens convencionais para caracterizar e sintetizar bibliotecas de CDR da região variável de anticorpos com mutações isoladas (ver e.g., Wu et al., 1998 PNAS 95:6037-42). As bibliotecas foram construídas nos vectores de expressão do bacteriófago M13 contendo genes da cadeia leve e da cadeia pesada de anticorpos compostos por sequências estruturais da região constante e da região variável humana, aqui descritos juntamente com as sequências CDR do invento. Nalguns casos, a CDR alvo é primeiro eliminada antes do emparelhamento dos nucleótidos. Empregou-se mutagénese baseada em codões para a síntese de oligonucleótidos para obtenção de sequências CDR do invento.

As bibliotecas foram inicialmente testadas por "capture lift" (captação por aplicação e levantamento de membrana) para identificar as variantes com maior afinidade. O processo de "capture lift" (Watkins, 2002 Methods Mol. Biol. 178:187-93) é conhecido na área e está descrito em WO/0164751 e US2002/0098189. Subsequentemente,

os clones pretendidos foram ainda caracterizados por titulação em antigénio imobilizado num ELISA e um ensaio de potência de proliferação celular como aqui descrito. Após tal rastreio, as constantes de dissociação (K_d), as velocidades de associação (K_{on}) e as velocidades de dissociação (K_{off}) foram determinadas para um clone com interesse.

Para identificar potenciais composições de ligação de anticorpos compreendendo a inserção de CDRs dadoras do invento, bibliotecas de CDRs sintéticas foram inseridas numa matriz com deleções como aqui descrito ou conhecido na área. As técnicas de mutagénese convencionais (Kunkel, 1985 PNAS 82:488-92) são empregues para substituir uma CDR particular usando um conjunto de oligonucleótidos mutagénicos. Tipicamente, o posicionamento da CDR dentro da região estrutural é conseguido usando o sistema como definido por Kabat com excepção de CDRH1, o qual é a soma das definições de Kabat e Chothia. Os oligonucleótidos mutagénicos são emparelhados com uma matriz fágica uridinilada em que a CDR correspondente foi eliminada.

O emparelhamento é conseguido por incubação de uma reacção a 85°C durante 5 minutos seguido de arrefecimento lento até 20°C ao longo de 45 minutos. As amostras emparelhadas são colocadas em gelo, a polimerase de DNA de T4 e a ligase de DNA de T4 foram adicionadas para gerar DNA de cadeia dupla e a reacção foi incubada durante 5 minutos a 4°C, seguido de 90 minutos a 37°C. A reacção é

extraída com fenol, precipitada com etanol e o DNA resultante electroporado para células DH10B. As células XL0LR foram adicionadas à reacção para permitir a amplificação dos fagos antes das bibliotecas serem semeadas. Os stocks de fagos foram preparados pela adição de 8 ml de meio de crescimento às placas seguido de incubação a 4°C durante um mínimo de 4 horas. O meio contendo fagos foi colhido e clarificado por centrifugação e adicionada azida de sódio (0,02%) como preservante.

O rastreio inicial das bibliotecas foi feito por levantamento de placas como descrito em Watkins *et al.* 1998 Anal. Biochem. 256:169-77; e Watkins, 2002 Methods Mol. Biol., 178:187-93. Os filtros contendo Fabs expressas a partir de placas individuais ligadas a anticorpo imobilizado anti-capa humana foram sequenciadamente incubados com TGF Beta-1 biotinilado (bio-TGF Beta-1), Neutravidina-fosfatase alcalina (NA-AP), com breves lavagens entre os dois. Os clones com interesse foram sequenciados e ainda caracterizados por ELISA. O ELISA, de um modo geral, usou placas Costar 3366 revestidas durante a noite, a 4°C, com 0,4 µg/ml de TGF Beta-1, TGF Beta-2 ou TGF Beta-3. As placas foram subsequentemente lavadas 2X antes da adição de 100 µl de solução de bloqueio (10 mg/ml de BSA em tampão de lavagem) a cada alvéolo. Diluições de Fabs foram incubadas nos alvéolos revestidos durante 1,5 h a 22°C. Após lavagem, foi adicionado um conjugado anti-capa humana-fosfatase alcalina e incubado durante 1 hora a 22°C. Adicionou-se um substrato colorimétrico após extensa

lavagem e a absorvância a A560 foi medida para identificar os clones positivos.

Ensaaios de Fabs por ELISA

Num exemplo não limitante, é empregue um ELISA que usa placas de microtitulação Costar 3366 revestidas durante a noite a 4°C com 0,4 µg/ml de TGF Beta-1, TGF Beta-2 ou TGF Beta-3 (TGF-Beta-1 (R&D Systems, Cat# 240-B/CF, 239 µg/ml), TGF Beta-2 (RDI, Cat # RDI-1035, 50 µg/ml) e TGF-Beta-3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF, 50 µg/ml) diluído para 0,4 µg/ml em tampão de revestimento). A placa foi subsequentemente lavada (2X) antes da adição de 100 µl de solução de Bloqueio (10 mg/ml de BSA em tampão de lavagem) a cada alvéolo. As diluições de Fabs do invento foram incubadas nos alvéolos revestidos (1,5 hr a 22°C). Após lavagem, foi adicionado um conjugado anti-capa humano-fosfatase alcalina e incubado (1 hr a 22°C). Um substrato colorimétrico foi adicionado após extensa lavagem e a absorvância medida a A560.

Num outro exemplo, as composições de ligação do invento foram testadas num ensaio de ELISA competitivo. Tipicamente, foi realizado um ensaio em fase líquida, em que um composto que deva competir com um antigénio para a ligação a uma composição de ligação, como seja um anticorpo, é combinado primeiro com o anticorpo em fase líquida, depois o grau de ligação do anticorpo ao antigénio é subsequentemente medido.

Materiais:

O tampão de revestimento de carbonato consiste em carbonato de sódio 50 mM pH 9,6. Os antigénios são TGF-Beta 1 (R&D Systems, Cat # 240-B/CF, 239 µg/ml), TGF-Beta 2 (RDI, Cat # RDI-1035, 50 µg/ml) e TGF-Beta 3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF, 50 µg/ml) diluído para 0,4 µg/ml em tampão de revestimento. O tampão de lavagem consiste em Tris 0,02M pH 7,4, NaCl 0,15M, 0,1% Tween 20 e solução de bloqueio de 10 mg/ml de BSA (Sigma A-4503) dissolvido em tampão de lavagem. As proteínas usadas como controlos positivos são rato anti-TGF-beta 1, 2 ou 3 humano (R&D Systems, cat# 1D11), rato anti-TGF-Beta 2 humano (R&D Systems, cat# BAF302) e rato anti-TGF-Beta 3 humano (R&D Systems, cat# BAF243), os quais foram diluídos para 1 µg/ml em tampão de bloqueio. O conjugado de anticorpo de detecção usado é anti-capá de rato peroxidase (Southern Biotech, cat# 1050-05), numa concentração de trabalho de 1:2000 em solução de bloqueio. O substrato usado para a reacção corada foi comprimidos de O-fenilenodiamina (OPD) (Sigma cat# P-6912), os quais foram dissolvidos em tampão substrato: Na₂HPO₄ 0,1M, pH até 5,0 com ácido cítrico 0,05M. A solução de trabalho do substrato OPD (*i.e.*, o volume para uma placa de 196 alvéolos) é preparada de fresco, antes da revelação das placas, dissolvendo comprimidos de OPD 1 x 5 mg em 12,5 ml de tampão substrato seguido da adição de 5 µl de 30% H₂O₂.

Protocolo:

Uma única placa de 96 alvéolos foi revestida com antigénio (TGF-Beta 1, 2 ou 3 a 0,4 µg/ml e distribuídos 50 µl por alvéolo) e depois fechada com fita adesiva antes do armazenamento (16-20 horas a 4°C). A placa foi subsequentemente lavada (2X) em tampão de lavagem (descrito atrás) antes da adição de 100 µl de solução de bloqueio (10 mg/ml de BSA em tampão de lavagem) a cada alvéolo. Após incubação (aproximadamente 1 hora a 22°C), a placa foi lavada (2X) com tampão de lavagem. Em seguida, 100 µl de amostra (diluída em tampão) ou controlo (diluído em PBS) foi adicionado a cada alvéolo e incubado (1,5 horas a 22°C). Após incubação, a placa foi lavada (6X) com tampão de lavagem antes da adição de 100 µl por alvéolo de conjugado anti-capa de ratinho-peroxidase (diluído a 1:2000 em solução de Bloqueio) ou SA-HRP (diluído a 1:10000 em solução de bloqueio). As amostras a testar foram deixadas a incubar (1 hora a 22°C) antes da adição de 100 µl de substrato OPD a cada alvéolo. Após revelação da cor (aproximadamente 10 minutos), a placa de 96 alvéolos foi medida a uma absorvância de 490 nm.

Os resultados positivos nestas condições são realizações Fab que produzem uma absorvância superior a 1,6 unidades a 490 nm com TGF-Beta 1, mas que apresentam valores significativamente mais baixos com TGF-Beta 2 e

TGF-Beta 3, demonstrando assim ligação específica e/ou selectiva para TGF-Beta 1.

Avaliação dos mAbs num ensaio baseado em células

Para testar a capacidade de uma composição de ligação do invento para neutralizar a bioactividade de TGF-Beta e para neutralizar uma isoforma de TGF Beta particular, pode-se adaptar o ensaio de proliferação de células HT-2 de Tsang *et al.*, (1995 Cytokine 7:389-97). O ensaio de proliferação de células HT-2 foi utilizado para determinar a potência *in vitro* das composições de Fab e de mAb. Resumidamente, células HT-2 proliferam na presença de IL-4 mas sofrem apoptose na presença de TGF-Beta. A morte celular induzida por TGF-Beta é inibida pela adição de um Fab ou mAb que neutralize TGF-Beta 1.

A linha celular humana HT-2 prolifera como resposta a UIL-4 mas a proliferação induzida por IL-4 é inibida por TGF-beta 1, TGF-Beta 2 ou TGF-Beta 3. Consequentemente, uma composição de ligação que é específica e/ou selectiva para TGF-Beta1 é neutralizante se inibir o efeito inibidor normal que TGF-beta 1 tem sobre as células HT-2 induzidas por IL-4. Assim, a proliferação celular induzida por IL-4 deverá prosseguir sem restrições se for adicionada suficiente composição de ligação específica de TGF-beta 1 a uma mistura de células HT-2 contendo TGF Beta 1. Consequentemente, a capacidade neutralizante dependente da dose das composições de ligação

do invento é avaliada usando o ensaio HT-2 na presença de isoformas de TGF particulares e medindo o sinal de proliferação de IL-4. O grau de proliferação celular é avaliado usando uma medida de proliferação celular colorimétrica comercial (e.g., CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay da Promega).

As células HT-2 são mantidas em RPMI 1640 suplementado com 10% FBS, penicilina/estreptomicina a 100 U/ml, respectivamente, 50 μ M beta-mercaptoetanol e 10 ng/ml de IL-2 humana (R&D Systems). As células foram centrifugadas a 1000 rpm numa centrífuga Jouan CR422 e ressuspensas em PBS. Após duas lavagens com PBS, as células foram finalmente ressuspensas a $0,15 \times 10^6$ células/ml em Meio de Ensaio que consiste em RPMI 1640 sem vermelho de fenol suplementado com 2% FBS, penicilina/estreptomicina a 100 U/ml e 100 μ g/ml respectivamente e 50 μ M beta-mercaptoetanol. A cada alvéolo de uma placa de 96 alvéolos foram adicionados 50 μ l de células em Meio de Ensaio. Antes da adição dos mAbs a testar ao bioensaio das células, diferentes concentrações dos mAbs foram pré-incubadas com 300 pg/ml de TGF-beta 1, TGF-Beta 2 ou TGF-Beta 3 (em Meio de Ensaio). Após uma incubação de 30 min, 50 μ l da mistura de TGF-Beta/Fab foram adicionados às células, seguido imediatamente de 50 μ l de Meio de Ensaio contendo 45 ng/ml de IL-4 murino (15 ng/ml final). Após uma incubação de 20-48 hr, foram adicionados 35 μ l de solução aquosa de Celltiter 96 (Promega Corp). Após mais 2 a 3 hr de incubação (37°C numa atmosfera de 5% de CO₂), o ensaio foi

quantificado por análise num leitor de placas de ELISA a 490 nm usando o ensaio colorimétrico CellTiter 96® (a quantidade de formazano gerado - conforme medido pela quantidade de absorvância a 490 nm - é directamente proporcional ao número de células vivas em cultura). Na Tabela 2 abaixo estão apresentados os dados modais.

Tabela 2 Bioensaio *in vitro* de células HT-2: Um ensaio de proliferação de células HT-2 foi usado para determinar *in vitro* a potência de composições de ligação de Fab e dos mAbs do invento. As células HT-2 proliferam na presença de IL-4 mas sofrem apoptose na presença de TGF-Beta. A morte celular induzida por TGF-Beta é inibida pela adição de uma composição neutralizante de TGF-Beta (como seja, e.g., um Fab ou mAb do invento). Comparativamente com IgG1 murino Fab #2471, as composições de ligação do invento mostram pelo menos 100 ou mais vezes maior potência de neutralização na prevenção da morte celular induzida por TGF-beta. Os IC₅₀s para as composições de mAbs variam entre aproximadamente 0,1-1,0 ng/ml (o IC₅₀ do mAb 2471 é de aproximadamente 0,1 µg/ml).

Composições de ligação de mAb anti-TGF-β1	Aumento (número de vezes) do IC ₅₀ relativamente ao mAb2471
21D1	106,8 + 16,1
DM4	391,0 + 5,2
DM7	140,0 + 29,2
C27	401,0 + 132,3

Medição das constantes cinéticas para Fabs

Um instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Inst. Inc.) foi usado para medir as cinéticas de ligação. Resumidamente, um antigénio foi covalentemente acoplado a esferas de alzacrona e a ligação de uma composição de ligação Fab livre do invento às esferas foi detectada no instrumento. Para medir K_d , tubos individuais contendo 20 pM de Fab (200 pM de fab (200 pM para o mAb) com antigénio seriadamente diluído (0-250 nM), foram incubados durante 1-6 dias a 25°C em PBS contendo 1% BSA, 0,02% azida e 0,01% Tween 20. Após incubação, Fab livre em cada uma das amostras equilibradas foi determinado no KinExA 3000 de acordo com as instruções do fabricante. Os valores de K_d foram determinados usando o programa KinExA 3000.

Para medir K_{on} , Fabs individuais a 2 nM foram misturados com 0-240 nM de antigénio usando o método de injeção de acordo com as instruções do fabricante e o Fab não ligado foi detectado. Os dados resultantes foram usados para calcular o k_{on} com o programa KinExA 3000. O K_{off} foi calculado usando a fórmula $K_d = K_{off}/K_{on}$.

Medição das constantes cinéticas dos mAbs

São conhecidos métodos alternativos de medição de constantes cinéticas, por exemplo: afinidade de uma composição de ligação para TGF-Beta 1 humano (R&D Systems, Cat # 240-B/CF), TGF-Beta 2 (RDI, Cat # RDI-1035) e TGF-

Beta 3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF) foi medida usando um instrumento BIAcore® 2000. O BIAcore® utiliza as propriedades ópticas da ressonância de plasmões de superfície para detectar alteração na concentração proteica de moléculas que interagem dentro de uma matriz biosensora de dextrano. Excepto quando referido, todos os reagentes e materiais foram adquiridos à BIAcore®AB (Upsala, Sweden). Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente. As amostras foram dissolvidas em tampão HBS-EP (cloreto de sódio 150 mM, EDTA 3 mM, 0,01% tensioactivo P-20 e HEPES 10 mM, pH 7,4). Proteína A recombinante foi imobilizada nas quatro células de fluxo de um chip sensor CM4 a um nível de 400-450 unidades de resposta (RUs) usando um kit de acoplagem de amina.

A ligação foi avaliada com múltiplos ciclos analíticos. Cada um dos ciclos foi realizado a um fluxo de 50 µl/minuto e consiste nos seguintes passos: injeção de 12 µl de uma composição de ligação de anticorpo a 0,5 µl/ml, a injeção de 250 µl de TGF-beta 1 (começando em 5 nM e usando diluições seriadas de duas vezes até 0,13 nM para cada ciclo, com duas injeções para cada concentração) seguido de um intervalo curto (85 minutos) ou longo (120 minutos) para dissociação e regeneração usando duas injeções de 50 µl de hidrocloreto de glicina 10 mM, pH 1,5. As velocidades de associação e dissociação para cada ciclo foram determinadas ajustando os dados do bio-sensor usando um modelo de dissociação simples com ClampXP (Center

for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. of Utah) para extrair as constantes de velocidade k_{on} e k_{off} ; a constante de equilíbrio de ligação K_d foi calculada usando a relação $k_d = k_{off}/k_{on}$. Os dados modais para as composições do invento estão na Tabela 3 apresentada abaixo.

Tabela 3 Afinidade de ligação e medições cinéticas para Fabs e mAbs do invento. Parâmetros de ligação em equilíbrio (K_d) e cinéticos (k_{on}) foram determinados usando Kinexa (k_{off} é calculado a partir de k_d e k_{on}). As propriedades de ligação em equilíbrio e cinéticas dos mAbs foram determinados usando Biacore. A constante de ligação em equilíbrio k_d foi calculada a partir de k_{on} e k_{off} determinadas. A comparação é com IgG1 Fab #2471. Devido à dissociação muito lenta, o k_{off} para 21D1 e DM7 é o limite superior detectável e são provavelmente muito mais lentos e, assim, os valores de k_d calculados são igualmente os limites superiores. Os valores são a média de medições repetidas (n=3-4).

	Dados de ligação de Fab (Kinexa)			Dados de ligação de Mab (Biacore)		
	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$ ($\times 10^{-6}$)	$K_{off} (seg^{-1})$, calc. ($\times 10^6$)	K_d (pM)	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$ ($\times 10^{-7}$)	$K_{off} (seg^{-1})$, ($\times 10^5$)	K_d (pM) (calc)
271	1,7	664	406	Nd	nd	Ndfd
21D1	4,0	3,4	0,9	$1,3 \pm 0,1$	$<0,6 \pm 0,6$	$<0,5 \pm 0,5$
DM4	4,2	5,1	1,2	$1,6 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,9$	$0,9 \pm 0,4$
DM7	4,5	2,3	0,5	$1,3 \pm 0,3$	$<0,7 \pm 0,4$	$<0,5 \pm 0,4$
C27	4,1	17	4,2	$1,3 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,4$
23A3	4,8	19	4,0	$1,9 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,8$	$0,8 \pm 0,6$

Determinação da especificidade do Mab

Os métodos BIAcore foram usados para determinar a capacidade das composições de mAbs do invento para se ligarem a outras entidades, especificamente à forma latente de TGF-Beta 1 ou de TGF-Beta 3. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente. As amostras foram dissolvidas em tampão HBS-EP (cloreto de sódio 150 mM, EDTA 3 mM, 0,01% (p/v) de tensioactivo P-20 e HEPES 10 mM, pH 7,4). A proteína A recombinante foi imobilizada em todas as quatro células de fluxo de um chip sensor CM4 num nível de 400-450 unidades de resposta (RUs) usando um kit de acoplagem de amina.

A ligação foi avaliada com múltiplos ciclos analíticos. Cada ciclo foi realizado a um fluxo de 100 µl/minuto consistindo nos seguintes passos: injeção de 15 µl de uma composição de ligação de anticorpo a 1 µg/ml, injeção de 250 µl de TGF-Beta 1 5nM, TGF-Beta 1 latente 5 nM, seguido de um intervalo curto (5 min) para dissociação e regeneração usando duas injeções de 50 µl de hidrocloreto de glicina 10 mM, pH 1,5. A quantidade de sinal após captura primeiro do Mab e depois do ligando foi determinada usando o programa informático de controlo do instrumento. Uma vez que o sinal é proporcional à massa da proteína capturada, a estequiometria do ligando capturado é facilmente calculada (Tabela 4).

Tabela 4 ligação de TGF-Beta 1, TGF-Beta 1 latente e TGF-Beta 3 aos Mabs (testado com ligando 5 nM).

Mab	Estequiometria de ligação doligando		
	TGF- β 1	TGF- β 1 latente	TGF- β 3
21D1	1,29	0,05	0,16
DM4	1,55	0,03	ND
DM7	1,23	0,04	0,54
C27	1,74	0,08	ND
23A3	1,63	0,07	1,26

Especificidade para TGF-Beta 1

As afinidades dos mAbs da composição de ligação para TGF- β 3 foram determinadas com métodos BIAcore. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente. As amostras foram dissolvidas em tampão HBS-EOP (cloreto de sódio 150 mM, EDTA 3 mM, 0,01% (p/v) de tensioactivo P-20 e HEPES 10 mM, pH 7,4). A proteína A recombinante foi imobilizada em quatro células de fluxo de um chip sensor CM4 num nível de 400-450 unidades de resposta (RUs) com um kit de acoplagem de amina. A ligação foi avaliada ao longo de múltiplos ciclos analíticos. Cada ciclo foi realizado a um fluxo de 100 μ l/minuto consistindo nos seguintes passos: injeção de 15 μ l de uma composição de ligação de anticorpo a 0,5 μ g/ml, injeção de 250 μ l de TGF- β 3 (começando a 5 nM e usando diluições seriadas de duas vezes para 0,13 nM para cada ciclo, com duas injeções para cada concentração) seguido de um intervalo curto (5 minutos) para dissociação

e regeneração usando duas injeções de 50 μ l de hidrocloreto de glicina 10 mM, pH 1,5.

As afinidades foram determinadas com base no sinal de equilíbrio atingido em diferentes concentrações de TGF- β 3 através da medição do sinal médio durante os últimos 10 segundos das injeções de TGF- β 3 e depois ajustando os sinais resultantes de todas as concentrações a um simples modelo de equilíbrio de ligação em SCRUBBER (Center for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. Utah). Os dados modelo, determinados para a composição de mAb humano testado do invento, de k_d e especificidade - calculado através da divisão de k_d para a ligação de TGF- β 3 pelo k_d para a ligação de TGF- β 1 (aqui) - estão apresentados abaixo na Tabela 5.

Tabela 5 Afinidade e especificidade relativa dos mAbs da composição de ligação testados para a ligação a TGF-Beta 3. Os erros, quando apresentados, representam o desvio padrão para múltiplas medições repetidas (n=3).

Mab	K_d (TGF- β 3), nM	Especificidade ($k_{d,\beta 3}/k_{d,\beta 1}$)
21D1	4,90	9800
DM4	0,53 $\pm$ 0,01	621
DM7	1,16 $\pm$ 0,18	2320
C27	2,20	3670
23A3	0,66 $\pm$ 0,04	1050

Exemplo 2: Modelo *in vivo* de fibrose hepática da ligação do canal biliar

Um modelo de ligação do canal biliar foi usado de forma semelhante ao descrito por Arias et al. (BMC Gastroenterology 3(29), 2003) para avaliar a eficácia *in vivo* de terapia anti-TGF- β 1. Resumidamente, ratos macho Sprague Dawley (250-300 g) foram anestesiados por inalação de isoflurano (2-3%) para o efeito. O abdómen foi rapado e esfregado com betadine e 70% de álcool etílico. Em condições estéreis, foi feita uma incisão média (~4cm) e o canal biliar comum foi isolado e ligado com seda cirúrgica 6-0 em duas posições, aproximadamente 1 cm de distância e depois transectado entre as ligações. A parede abdominal foi fechada com sutura com seda 4-0 e a pele agrafada uma à outra. A administração de uma composição anti-TGF- β 1 e controlo isotipo de ratinho (IgG) foi iniciada no dia da cirurgia e de 7 em 7 dias a partir de então. Aos 4 e 12 dias pós-cirurgia, os ratos foram eutanasiados e as enzimas hepáticas no soro, contagem de sangue total e histologia do fígado (corantes tricromo e H&E) foram processados para determinar o efeito do tratamento.

Exemplo 3: Modelo *in vivo* de fibrose do pulmão

Existe uma série de modelos para avaliação da eficácia *in vivo* de composições anti-TGF-beta na fibrose pulmonar. Por exemplo, um modelo de bleomicina aplicado como descrito por Pittet, et al. (JCI 107, 1537-1544,

(2001) foi usado para avaliar a melhoria numa abordagem anti-TGF-beta. Um outro modelo é o modelo de reovírus respiratório 1/L (ver, e.g., Bellum et al., Am. J. Pathol., 150, 2243; ou London et al., Clin. Immunol. 103, 284; e London et al., Exp. Mol.Pathol., 72, 24-36). Resumidamente, usando ratinhos, no dia 1, Reovírus 1/L, i.n. 1×10^7 pfu (30 µl total) foi aplicado através da narina, seguido nos dias 3, 7, 12 de diferentes concentrações de composição de ligação anti-TGF-beta do invento ou de um mAb controlo de isotipo como aqui descrito ou conhecido na área. Os animais foram monitorizados no decurso do tratamento para sinais de distrofia respiratória, perda de peso e mortalidade. No dia 14 após início do tratamento, os animais foram eutanasiados e preparadas amostras de pulmão para exame histopatológico (H/E) para avaliar o desenvolvimento e/ou progressão de doença pulmonar (com o teor de hidroxiprolina analisado para medição de fibrose).

Exemplo 4: Modelo in vivo de glomerulonefrite anti-Thy1.1

O modelo de rato anti-Thy1.1 é um modelo bem estabelecido de glomerulonefrite mesangioproliferativa (ver, e.g., Morita et al., 1998 Am. J. Kidney Dis 31:559-73; Bagchus, et al., 1986 Lab. Invest. 55:680-7 e Yamamoto & Wilson 1987 Kidney Int. 32:514-25) em que a injeção de um anticorpo dirigido contra o antigénio Thy localizado na superfície de células mesangiais induz mesangiólise seguido de uma fase de proliferação compensatória de células mesangiais resultando em níveis elevados de proteína

urinária (proteinúria). O modelo de nefrite anti-Thy1.1 assemelha-se em muitos aspectos a nefrite de IgA humana ou púrpura de henoch-Schonlein (O'Donoghue, *et al.*, 1991 J. Clin. Invest. 88:1522-30) e foi usado para testar potenciais abordagens terapêuticas à doença renal através da determinação da capacidade das composições a testar para fazerem decréscimos de proteinúria relacionados com a dose (ver, *e.g.*, Burg *et al.*, 1997 Lab Invest 76:505-16; Johnson, *et al.*, 1995 Kidney Int 47:62-9).

Para testar as composições de ligação do invento neste modelo, ratos Sprague Dawley machos (200-260 gramas; aproximadamente 9 semanas de idade), marcados individualmente, foram aclimatados durante cinco dias pré-tratamento com acesso livre a alimentos e água numa dieta convencional. Uma determinação da proteína pré-urinária foi feita no dia -5 do pré-tratamento. Os ratos receberam uma identificação individual através de marcação na cauda com um marcador corado, assim como marcação da orelha antes da colheita de sangue por punção retro-orbital e distribuídos ao acaso por 5 grupos com base no peso do corpo no dia 1.

O estudo foi realizado de forma cega, relativamente aos grupos de tratamento, e não cega no final do estudo. Os grupos receberam 1,25 mg de mAb anti-Thy1.1 ou PBS como injeção controlo via veia do pénis no dia 0. As composições de ligação foram preparadas e purificadas usando condições convencionais ou como aqui descrito. O mAb controlo IgG1 de ratinho (11513) é material purificado com proteína A ressuspenso em PBS pH 7,2 e foi adquirido a

Harlan Bioproducts for Science, Indianapolis, IN 46229-0176.

Produziu-se anti-Thy 1.1 de ratinho em culturas de 2 x 10L de hibridoma de ratinho. O meio condicionado foi combinado, concentrado para 18X e subsequentemente purificado. Aproximadamente, 764 ml do sobrenadante colhido concentrado foi misturado com Glicina 1,5M/NaCl 3,0M pH 8,9 e aplicado numa coluna de 137 ml de proteína A Sefarose pré-equilibrada em Glicina 1,5M/NaCl 3,0 M pH 8,9. A coluna de Proteína A foi então lavada com Glicina 1,5M/NaCl 3,0 M pH 8,9. A coluna foi eluída com ácido cítrico 100 mM pH 3,0. As fracções seleccionadas do eluato que correspondem a IgG foram reunidas, ajustadas a pH 7,4 com NaOH 1M e aplicadas numa coluna de 318 ml de Pharmacia Superdex 200 equilibrada em PBS, pH 7,4 cloreto de sódio. O pico correspondendo em tamanho a IgG foi reunido, distribuído em pequenas quantidades e guardado a -20°C.

Uma hora após administração do mAb anti-Thy1.1, os animais foram doseados subcutaneamente com isotipo ou composições de anticorpo anti-TGF-Beta 1 do invento. Os anticorpos foram novamente doseados no dia 7, os animais foram testados nos quatro grupos de tratamento que se seguem:

1) Testemunhas; injeção de PBS

2) Anti-thy1.1 com anticorpo controlo de isotipo
a ~12,5 mg/kg ou 2,5 mg/dose

3) Anti-thy1.1 anticorpo DM4 a ~5 mg/kg ou 1 mg/dose

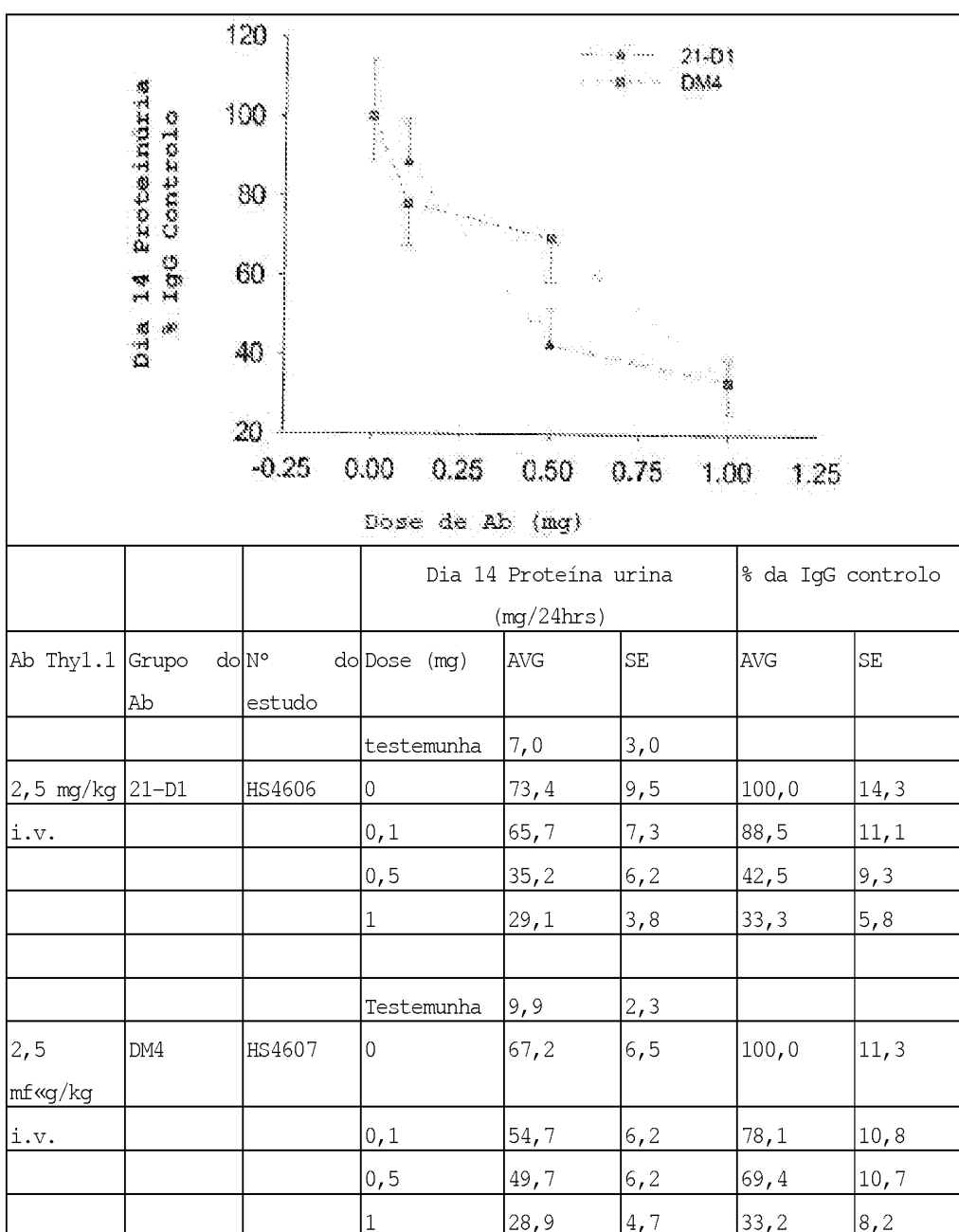
4) Anti-thy1.1 com anticorpo DM7 a ~12,5 mg/kg ou 2,5 mg/dose

5) Anti-thy1.1 com o anticorpo C27 a ~12,5 mg/kg ou 2,5 mg/dose

Os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas durante um período de 24 hr nos dias -5 e 13. No dia 14, os ratos foram mortos com CO₂ e colhido sangue por punção cardíaca para se obter sangue para análise. O rim esquerdo foi fixado com 4% de paraformaldeído em PBS e guardado em 70% de etanol para posterior análise histológica. Qualquer rato que ficasse moribundo, era sacrificado (CO₂) e processado relativamente às concentrações de proteína na urina e de azoto da ureia no sangue. As concentrações da proteína da urina e do azoto da ureia no sangue (BUN) foram analisadas num analisador automático HITACHI 911 com controlos da Biorad de acordo com as instruções do fabricante.

Os dados do modelo na Tabela 6 abaixo mostram que as composições de ligação do invento possuem uma capacidade importante para atenuar a lesão renal *in vivo* e para reduzir a proteinúria elevada associada à lesão renal induzida pelo mAb anti-Thy1.1.

Tabela 6. Os ratos foram injectados i.v. com 2,5 mg/kg de um mAb α -Thy1.1 seguido, 30 min mais tarde, de 1 mg de Herceptin para os estudos com 21D1 e DM4. Uma segunda dose de mAb anti-TGF-Beta 1 controlo foi administrada no dia 7 e os animais foram mortos no dia 14. As composições de ligação dos mAbs 21D1 e DM4 baixaram os níveis de proteína na urina (protenúria) numa forma dependente de dose.



Exemplo 5: Mapeamento de epitopos das composições de ligação a TGF- β 1.

Uma combinação de marcação H/Dex e química foi usada para mapear epitopos das composições de ligação a TGF- β 1 do invento como sejam, por exemplo, anticorpos. Uma vez que a permuta H/D e a modificação química dependem da acessibilidade do solvente aos resíduos de aminoácidos, as alterações na solubilidade do solvente após formação de um complexo de composição de ligação:TGF Beta 1 podem ser usadas para identificar resíduos envolvidos na ligação do anticorpo. Subsequentemente à permuta H/D ou modificação química, a digestão proteolítica em fragmentos de clivagem peptídicos do antigénio inicialmente ligado permite comparações de pesos moleculares entre fragmentos (usando LC/MS) para determinar quais os resíduos de aminoácidos bloqueados na permuta H/D ou na modificação química após formação do complexo de ligação.

Marcação química das proteínas de superfície

Alíquotas de 15 μ g de TGF- β 1 a 1 mg/ml em solução de HCl 4 mM foram transferidas para recipientes de plástico, aos quais foi adicionado 180 μ g de um controlo ou de uma composição de anticorpo contra TGF- β 1 do invento (TGF- β 1/anticorpo = ½ de proporção molar). Adicionou-se soro fisiológico tamponado com fosfatos (PBS) a cada um dos recipientes para um volume final de 150 μ l e as soluções foram deixadas a incubar (para permitir a formação de um

complexo de ligação) à temperatura ambiente durante pelo menos 10 min antes de marcação das proteínas de superfície. Para a marcação química, 7,5 µl de uma solução de éster de ácido acético hidroxilsuccinimida (AHSE) a 5 mg/ml foi adicionado a cada recipiente com complexo e as misturas foram então incubadas à temperatura ambiente (AHSE/anticorpo = 200/1 de proporção molar). A diferentes tempos (e.g., 10, 20 e 60 min), 50 µl da solução da mistura foi parada através da mistura com 50 µl de 1mg/ml K em tampão Tris 0,1 M, pH 8,0. A solução foi directamente analisada por LC/MS (como aqui descrito). A restante solução de cada amostra foi tratada com 3-5 µl de solução de DTT a 50 mg/ml a 37°C (10-15 min) para reduzir as ligações dissulfureto de TGF-β1 maduro.

A solução de proteína reduzida foi subseqüentemente tratada com 3 µl de solução de quimiotripsina a 37°C durante 2-3 horas e depois tratada com 1 µl de solução Glu-C a 0,25 mg/ml a 37°C durante mais 2-3 horas. Esta reacção foi parada pela adição de 0,5 µl de ácido acético glacial e depois analisado por LC/MS, usando um HPLC Waters 2795 e um espectrómetro de massa Micromass LTC Premier. O HPLC usou uma coluna Zorbax, SB C18, 2,1 x 50 mm, à temperatura ambiente e as proteínas e péptidos foram eluídos com um gradiente de acetonitrilo em 0,15% de ácido fórmico; usou-se um tempo de corrida de 14 minutos para a proteína intacta e um tempo de corrida de 75 minutos para os produtos de digestão proteolítica.

Para os resíduos de lisina (K) na superfície de TGF- β 1 ou dentro ou estruturalmente perto do epitopo, a acetilação do grupo amino K foi bloqueada (parcialmente ou completamente) após uma composição a testar se ligar a TGF- β 1. A comparação do grau de acetilação entre um péptido de uma amostra complexada (TGF- β 1 + anticorpo que se liga a TGF- β 1) ou não complexada (TGF- β 1+ anticorpo controlo que não se liga a TGF- β 1) permite identificar os resíduos de aminoácidos bloqueados na acetilação pela formação do complexo de ligação. Um modelo de dados de acetilação obtidos sob tal análise LC/MS está apresentado abaixo na Tabela 7.

Tabela 7. Mole de grupo aminoacetilado por mole de péptido obtido por LC/MS para o mapeamento de epítomos

Tempo de ac.	Complexo	Mole de acetilação/mole de péptido											
		1-6	9-21	22-30	22-32	31-39	33-43	51-62	53-62	66-90	91-112	91-99	100-112
10 min	TGFβ1+Cont.	0,97	0,10	0,07	0,94	0,74	0,22	0,64	0,60	0,00	1,09	1,28	0,03
	TGFβ+21D1	0,95	0,09	0,07	0,95	0,78	0,26	0,50	0,45	0,00	0,49	0,71	0,02
	TGFβ+DM4 *	0,91	0,10	0,04	0,88	0,56	0,05	0,31	0,29	0,00	0,35	0,59	0,02
	TGFβ1+DM4 #	0,91	0,07	0,06	0,92	0,62	0,13	0,30	0,28	0,00	0,39	0,66	0,02
20 min	TGFβ1+Cont.	1,00	0,25	0,14	0,99	0,89	0,35	0,82	0,79	0,00	1,32	1,57	0,05
	TGFβ1+21D1	1,00	0,27	0,15	1,00	0,95	0,42	0,76	0,71	0,00	1,01	0,96	0,04
	TGFβ+DM4*	1,00	0,23	0,06	0,95	0,76	0,09	0,52	0,51	0,00	0,55	0,81	0,03
	TGFβ1+DM4#	1,00	0,21	0,12	0,97	0,85	0,22	0,59	0,58	0,00	0,63	0,88	0,04
60 min	TGFβ1+Cont.	0,97	0,67	0,30	1,03	1,03	0,56	0,87	0,82	0,00	1,68	1,85	0,10
	TGFβ1+21D1	0,97	0,79	0,36	1,08	1,21	0,73	0,93	0,92	0,00	1,24	1,39	0,08
	TGFβ1+DM4*	0,91	0,80	0,16	0,99	0,95	0,26	0,85	0,80	0,00	0,91	1,13	0,08
	TGFβ1+DM4#	0,99	0,66	0,36	1,06	1,10	0,51	0,93	0,91	0,00	1,14	1,25	0,09

* e # indicam que os dois lotes diferentes do anticorpo DM4 foram caracterizados separadamente

Considerando tais dados do modelo, as diferenças entre os complexos de TGF- β 1:anticorpo e os controlos são discerníveis para vários fragmentos peptídicos TGF- β 1, especialmente como se mostra para períodos curtos de acetilação (e.g., 10 min). Os fragmentos que englobam os resíduos 31-39, 33-43, 53-62 e 91-112 demonstram tais diferenças discerníveis. Ambos os fragmentos 31-39 e 33-43 compreendem o resíduo K37. O fragmento 22-32, o qual compreende K26 & K31, não mostra diferença significativa relativamente aos controlos, assim as diferenças de acetilação do fragmento 31-39 são atribuíveis ao bloqueio de K37 na acetilação após formação do complexo antigénio:anticorpo.

Os fragmentos 53-62 e 91-112 apresentam diferenças persistentes na gama testada e para cada anticorpo testado. O fragmento 53-62, mostra menos diferenças na gama de acetilação superior (60 min), no entanto, em condições de proporções inferiores de AHSE/anticorpo, tais diferenças mantêm-se inalteradas ao longo da gama. Não estando preso à teoria, uma interpretação de tais dados é que K60 não está directamente envolvido na ligação antigénio:anticorpo mas a sua proximidade ao complexo de ligação é suficientemente perto para bloquear a acessibilidade de AHSE ao resíduo K60, bloqueando assim a acetilação. Como alternativa, K60 pode compreender o epitopo definido pelo anticorpo testado.

O fragmento 91-112 mostra diferenças de acetilação ao longo da gama testada, sugerindo que pelo menos um de três resíduos de lisina deste fragmento (K95, K97 ou K110) participa no complexo composição de

ligação:TGF Beta 1. Para identificar os resíduos de lisina envolvidos, a digestão quimotríptica foi ainda tratada com Glu-C produzindo dois fragmentos adicionais - 91-99 e 100-112. Este último (fragmento 100-112) possui K110, no entanto, não apresenta diferença significativa na acetilação sugerindo que está inacessível ao solvente ou à modificação química.

O primeiro (fragmento 91-99) contendo K95 e K97 foi ainda testado usando TGF- β 1 tratado com AHSE e análise MS/MS para determinar os tempos de eluição das espécies com uma única acetilação e para quantificar o grau de acetilação de K95 ou K97 (dados do modelo em tais condições estão apresentados na Tabela 8). Tais dados mostram que a acetilação de K97 permanece inalterada com ou sem formação do complexo, no entanto, a presença de uma composição de anticorpo do invento afecta significativamente a acetilação de K95 indicando que K95 está directamente envolvido na formação do complexo de ligação.

Tabela 8. Acetilação de K95 & K97

Tempo de acetilação	Complexo TGF β 1 & Anticorpo	Acetilação (%)	
		K97	K95
10 min	TGF- β 1+controlo	54	73
	TGF- β 1+LA307-21D1	51	20
	TGF- β 1+LA307-DM4*	44	16
	TGF- β 1+LA307-DM4#	46	18
20 min	TGF- β 1+LA307-21D1	66	27
	TGF- β 1+LA307-DM4*	59	22
	TGF- β 1-LA307-DM4#	63	25

(continuação)

Tempo de acetilação	Complexo TGF β 1 & Anticorpo	Acetilação (%)	
		K97	K95
60 min	TGF- β 1+Controlo	87	95
	TGF- β 1+LA307-21D1	86	53
	TGF- β 1+LA307-DM4*	75	38
	TGF- β 1+LA307-DM4#	82	42
* e # indicam que foram caracterizados os dois lotes diferentes de anticorpo DM4			

Permuta H/D

No mapeamento de epitopos, a técnica de permuta de deutério/hidrogénio (H/D) assemelha-se à marcação de superfície de proteínas/MS. No entanto, a permuta H/D não é específica de resíduo e assim pode detectar alterações em qualquer resíduo de aminoácido. Ao comparar-se um complexo de composição de ligação: TGF Beta 1 com uma proteína TGF- β 1 madura não complexada, o peso molecular da proteína complexada é cerca de 20 Da (ou 30 Da a 100% D₂O) inferior a TGF- β 1 não complexado. Assim, através do cálculo das diferenças de peso D₂O entre TGF- β 1 complexado e não complexado pode-se mostrar que aproximadamente trinta resíduos de aminoácido no dímero TGF- β 1 maduro podem participar na formação de um complexo de ligação do invento.

Alíquotas de 120 μ g (~140 ou 280 μ l) de soluções de anticorpos foram sujeitas a permuta de tampão para PBS através de concentração e diluição sucessivas usando um

concentrador de proteínas por ultrafiltração Microcon (30 kD) (Millipore). Após duas concentrações e diluições sucessivas com PBS, as soluções de anticorpo foram concentradas, removidas, ajustadas a um volume final de 70 μ l com PBS. Em seguida, 10 μ l de TGF- β 1 a 1 mg/ml em HCl 4 mM e 2 μ l de tampão tris 1M, pH 8,0, foram adicionados a cada recipiente com anticorpo para formar um complexo TGF- β 1:anticorpo. Uma amostra controlo de TGF- β 1 foi preparada misturando 70 μ l de 1X PBS, 20 μ l de TGF- β 1 em solução de HCl 4 mM e 2 μ l de tampão tris 1M, pH 8,0. Subsequentemente, 9 μ l de TGF- β 1 ou do complexo TGF- β 1 anticorpo foi transferido para um micro-recipiente de plástico e depois 21 μ l de D₂O a 100% foi adicionado para formar uma solução a 70% de D₂O. A solução foi incubada à temperatura ambiente durante 10 min e depois a 0°C durante 1 min.

Após incubação, a permuta H/D é parada e a proteína digerida pela adição de 15 μ l de solução a 1% de ácido fórmico (a 0°C) e 4 μ l de solução de pepsina a 2mg/ml (a 0°C), e depois incubação a 0°C durante 5 min. O produto da digestão foi imediatamente injectado na coluna manualmente para análise LC/MS (como atrás descrito, excepto a tubagem e a coluna de HPLC serem imersas num banho de gelo-água).

TGF- β 1 maduro resiste à digestão com pepsina a pH baixo (~2,5) e a temperatura baixa (0°C) devido à formação de ligações dissulfureto. Como resultado, foram produzidos poucos péptidos de clivagem e a maioria de TGF- β 1 ainda

está intacta apesar de tempos de digestão mais longos e de maiores concentrações de enzima:proteína. Os fragmentos proteolíticos de TGF- β 1 identificáveis são tipicamente gerados no extremo C e nas regiões centrais da proteína (e.g., fragmentos 58-64 ou 61-64). Os dados do modelo para a alteração na massa (massa delta) após permuta D/H usando tais fragmentos estão apresentados abaixo na tabela 9. A massa delta para o fragmento 61-64 é de aproximadamente zero, enquanto a massa delta para o fragmento 58-64 é de aproximadamente 1 Da sugerindo que a região protegida da permuta de deutério - após formação do complexo com uma composição de ligação do invento - compreende os resíduos de aminoácidos 58-61.

Tabela 9. Massas delta dos péptidos pépticos de TGF-Beta 1 identificados após permuta D/H

	Péptidos pépticos de TGF- β 1					
Massa delta (100%D ₂ O) *	61-64	59-64	58-64	58-61	91-104	90-104
Média para DM4 (n=3)	0,04	-0,87	-1,02	-0,30	-1,85	-1,87
SD para DM4 (n=3)	0,01	0,11	0,21	0,05	0,30	0,30
para 21D1 (n=1)	0,01	-0,34	-0,99	-0,18	-1,90	-1,51

Mutagenese de TGF Beta 1

```

      1                                     50
TGFb1 (normal) (1) ALDTNYCESSTEKNCCVROLYIDFKRLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPY
TGFb1 (muten)  (1) ALDTNYCESSTEKNCCVROLYIDFKRLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPY

      51                                     100
TGFb1 (normal) (51) IWSLEDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPOALEPLPIVYYVGRKPKVEQ
TGFb1 (muten)  (51) IWSLEDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPOALEPLTILYYVGRTPKVEQ

```

TGFβ1 (normal) (101) ~~LSNMIVR5CKCS~~ {SEQ ID NO: 1}

TGFβ1 (mutain) (101) ~~LSNMIVR5CKCS~~ {SEQ ID NO: 144}

Para melhor definir epitopos para composições de ligação do invento, foram usadas técnicas de mutagénese convencionais para identificar resíduos de TGF beta 1 críticos na formação de complexos de ligação com as composições do invento. A estrutura cristalina do complexo TGF-beta 3/TGF-Beta RII (2002 Nat. Struct. Biol. 3:203-8) foi usada como modelo para definir locais importantes de mutagénese da proteína TGF-Beta 1 - R25K, K26R, V33I, P87T, V89L e K95T (mostrado atrás).

A capacidade de ligação das muteínas de TGF Beta 1 foi testada usando composições de ligação específicas para as isoformas de TGF Beta e mAbs comerciais (1D11 e 240; R&D Systems), as quais inibem a ligação de TGF Beta ao seu receptor cognato (TGF-Beta RII). Os testes foram realizados por análise num espectrómetro de massa induzido por laser de desabsorção/ionização e tempo de voo. Os mAbs a testar, tais como, e.g., o mAb 3821 e 2471, os quais especificamente se ligam a TGF Beta 1 (descrito na Publicação internacional N° WO2005/010049) e controlos, tais como, e.g., mAb 1D11, o qual se liga às três isoformas de TGF Beta (proporcionando uma oportunidade para se complexar com a proteína TGF Beta 1 (muteína ou selvagem) imobilizada em chips de detecção, exposto a laser e

subsequentemente analisados com programas convencionais segundo as condições do fabricante (CIPHERGEN Diagnostics).

Os resultados do modelo mostram que uma subsérie distinta de resíduos de aminoácidos na interface de ligação de TGF Beta 1/TGF-beta RII difere das outras isoformas de TGF-Beta (TGF Beta 2 e TGF Beta 3). O mAb #2471 a testar (com afinidade de ligação específica para TGF Beta 1) liga-se a TGF-Beta 1 selvagem a uma velocidade cinco vezes superior relativamente à muteína TGF Beta 1, enquanto os mAbs 3821 e 1D11 se ligam à muteína TGF-beta 1 a uma velocidade que é duas vezes menos e meia vez menos que TGF Beta 1 selvagem.

Listagem de sequências

SEQ ID NO:1 é a sequência de aminoácidos de TGF Beta 1 maduro de *Homo sapiens*.

SEQ ID NOS:2 e 141 são sequências de aminoácidos de VHCDR1 artificial.

SEQ ID NOS:3 e 142 são sequências de aminoácidos de VHCDR2 artificial.

SEQ ID NOS:4 e 143 são sequências de aminoácidos de VHCDR3 artificial.

SEQ ID NOS:4 e 143 são sequências de aminoácidos de VHCDR3 artificial.

SEQ ID NOS:5 e 138 são sequências de aminoácidos de VLCDR1 artificial.

SEQ ID NOS:6 e 139 são sequências de aminoácidos de VLCDR2 artificial.

SEQ ID NOs: 7 e 140 são sequências de aminoácidos de VLCDR3 artificial.

SEQ ID NO: 8 é a sequência de aminoácidos da região estrutural de HCVR FR1 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NO: 9 é a sequência de aminoácidos da região estrutural de HCVR FR2 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NO: 10 é a sequência de aminoácidos da região estrutural de HCVR FR3 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NO: 11 é a sequência de aminoácidos da região estrutural de HCVR FR4 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NO: 12 é a sequência de aminoácidos da região estrutural de LCVR FR1 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NOs: 13-36 SÃO sequências de aminoácidos da região estrutural de LCVR FR2 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NO: 37 é a sequência de aminoácidos da região estrutural de LCVR FR3 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NO: 38 é a sequência de aminoácidos da região estrutural de LCVR FR4 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NO: 39 é a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia pesada de IgG1 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NO: 40 é a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia pesada de IgG4 de *Homo sapiens*.

SEQ ID NO: 41 é a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia leve de *Homo sapiens*.

SEQ ID NOS: 42-86 são sequências artificiais de aminoácidos da região variável da cadeia leve.

SEQ ID NOS: 87-125 são sequências artificiais de aminoácidos de HCVR.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> Composições de ligação; Reagentes relacionados

<130> X-16598

<160> 135

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> primata

<400> 1

Ala	Leu	Asp	Thr	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Ser	Thr	Glu	Lys	Asn	Cys	Cys
1				5					10					15	

Val	Arg	Gln	Leu	Tyr	Ile	Asp	Phe	Arg	Lys	Asp	Leu	Gly	Trp	Lys	Trp
		20						25					30		

Ile	His	Glu	Pro	Lys	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Phe	Cys	Leu	Gly	Pro	Cys
		35					40					45			

Pro	Tyr	Ile	Trp	Ser	Leu	Asp	Thr	Gln	Tyr	Ser	Lys	Val	Leu	Ala	Leu
	50					55					60				

Tyr	Asn	Gln	His	Asn	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro
65					70				75						80

Gln	Ala	Leu	Glu	Pro	Leu	Pro	Ile	Val	Tyr	Tyr	Val	Gly	Arg	Lys	Pro
				85					90					95	

Lys	Val	Glu	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Ile	Val	Arg	Ser	Cys	Lys	Cys	Ser
			100					105					110		

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> primata

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na posição 3 = Thr ou Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa na posição 5 = Thr, Glu ou Phe

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa na posição 9 = Met, Ile, Leu ou Val

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa na posição 10 = His, Val ou Ala

<400> 2

Gly Tyr Xaa Phe Xaa Asp Tyr Asn Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Primata

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na posição 1 = Tyr, Gln ou Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa na posição 2 = Ile ou Val

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa na posição 8 = Asp ou Glu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na posição 11 = Tir, Thr, His ou Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa na posição 13 = Gln, Lys, Pro ou Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa na posição 15 = Phe ou Tyr

<400> 3

Xaa Xaa Tyr Pro Tyr Asp Gly Xaa Thr Gly Xaa Asn Xaa Lys Xaa Lys
 1 5 10 15

Ser

<210> 4

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Primata

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa na posição 4 = Trp ou Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa na posição 5 = Phe ou leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa na posição 6 = Ala, Glu ou Tyr

<400>4

Gly Tyr Arg Xaa Xaa Xaa Tyr
 1 5

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Primata

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na posição 1 = Arg, Tyr, Glu ou Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na posição 3 = Ser ou Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa na posição 4 = Ser, Val ou Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa na posição 5 = Ser ou Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa na posição 7 = Ser, Pro, Leu ou Tyr

<400> 5

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Val Xaa Tyr Met His
 1 5 10

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Primata

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa na posição 5 = Leu, Asn ou pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa na posição 7 = Ser, Lys, Tyr, Leu, Met, Phe, Glu, Gln, Arg
 ou His

<400>6

Ala Thr Ser Asn Xaa Ala Xaa
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Primata

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na posição 1 = Gln ou Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa na posição 5 = Leu, Asp ou Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa na posição 6 = Asn ou Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa na posição 7 = Pro, Phe, Tyr ou Arg

<400> 7

Xaa Gln Trp Asp Xaa Xaa Xaa Pro Ala
 1 5

<210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Primata

<400> 9

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

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> Primata

<400> 10

Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Primata

<400> 11

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 12
<211> 23
<212> PRT
<213> Primata

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 13

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 14

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 15

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 16

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 17

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 18

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 19

<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 19

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 20

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 21

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 22

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 23

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 24

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 25

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 26

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 27

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 28

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 29

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Primata

<400> 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 31

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 32

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 33

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 34

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 35

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Primata

<400> 36

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Primata

<400> 37

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Primata

<400> 38

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 39

<211> 328

<212> PRT

<213> Primata

<400> 39

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 1 5 10 15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 20 25 30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 50 55 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 65 70 75 80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<211> 326

<212> PRT

<213> Primata

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

- 162 -

```
<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Primata
```

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

<210> 42

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 42

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 43
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 44

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Leu Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 46

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Tyr Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Glu Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 49

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Asn Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 50
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata
 <400> 50
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Met Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 51

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 52
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Phe Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 53

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Asp Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Arg Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 55

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 56

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 57

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 58

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 58

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 59

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 59

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

<210> 60

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 61
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 61

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 62

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 62

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Val Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 63

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 63

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Leu Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 64

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 64

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Ser Ser Val Leu Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 65

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 66

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 66

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 67

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 67

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

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

```

<210> 68
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 68

```

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

```

<210> 69

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 69

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 70
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 70

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 71

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 71

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 72

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 72

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 73

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 73

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 74

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 74

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ala Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 75

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ala Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 76

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 76

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 77
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 77
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 78

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 78

```

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

```

<210> 79
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 79

```

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

```

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 80
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 80

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 81
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 81

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 82

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 83

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 83

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 84

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 84

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 85

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 85

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

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

```

<210> 86

<211> 106

<212> PRT

<213> Primata

<400> 86

```

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

```

<210> 87

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 87

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 88
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 88

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 89

<211> 115

<212> PRT

<213> Primata

<400> 89

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

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr Asn
20 25 30

Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
35 40 45

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 90

<211> 115

<212> PRT

<213> Primata

<400> 90

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 91

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 91

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 116
<212> PRT
<213> Primata

<400> 92

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 93
<211> 116
<212> PRT
<213> Primata

<400> 93

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 94

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 94

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 95

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 95

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 96

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 96

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 97

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 97

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Val Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 98

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 98

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 99

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 99

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Phe Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 100
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 100

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Thr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 101
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 101

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly His Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 102

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 102

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Leu Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 103

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 103

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 104

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 104

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Ile Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 105

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 105

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 106

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 106

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Ser Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Pro Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 107

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 107

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 108

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 108

```

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

ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
          20          25          30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
          50          55          60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100          105          110

Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 109
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 109

```

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

ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
          20          25          30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
          50          55          60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

```

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 110

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 110

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 111

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 111

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 112

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 112

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 113

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 113

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 114

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 114

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 115

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 115

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Val Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 116

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 116

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

<210> 117

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 117

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

85

90

95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 118

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 118

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 119

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 119

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr val ser Ser
115

<210> 120

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 120

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Ser Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr val ser Ser
115

<210> 121
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 121

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Tyr
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 122
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 122

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Ser Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 123

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 123

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 124

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 124

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 125

<211> 116

<212> PRT

<213> Primata

<400> 125

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 126

Gln Gln Trp Asn Gly Asn Pro Pro Ala
 1 5

<210> 127
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 127

Gln Gln Trp Asp Ser Asn Pro Pro Ala
 1 5

<210> 128
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 128

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

Ser

<210> 129
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 129

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met His
 1 5 10

<210> 130
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Primata

<400> 130

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Glu Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 131

<211> 442

<212> PRT

<213> Primata

<400> 131

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 132

<211> 213

<212> PRT

<213> Primata

<400> 132

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

- 216 -

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 134

<211> 442

<212> PRT

<213> Primata

<400> 134

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

- 220 -

```
<210> 135
<211> 213
<212> PRT
<213> Primata
<400> 135
```

	85		90		95
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
		100			
			Glu	Ile	Lys
				105	
					Arg
					Thr
					Val
					Ala
					Ala
					Pro
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
		115			
					Pro
					Ser
					Asp
					Glu
					Gln
					Leu
					Lys
					Ser
					Gly
					Thr
Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
					Leu
					Asn
					Asn
					Phe
					Tyr
					Pro
					Arg
					Glu
					Ala
					Lys
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
					Asn
					Ala
					Leu
					Gln
					Ser
					Gly
					Asn
					Ser
					Gln
					Glu
					145
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp
					Ser
					Lys
					Asp
					Ser
					Thr
					Tyr
					Ser
					Leu
					Ser
					Ser
					165
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys
					Ala
					Asp
					Tyr
					Glu
					Lys
					His
					Lys
					Val
					Tyr
					Ala
					180
Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln
					Gly
					Leu
					Ser
					Ser
					Pro
					Val
					Thr
					Lys
					Ser
					Phe
					195
Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
					210

Lisboa, 29 de Abril de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que neutraliza TGF- β 1 humano e possui um Kd inferior a 40 pM para TGF- β 1 humano, compreendendo uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve seleccionadas do grupo consistindo em:

i) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:90 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQID NO:43;

ii) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:92 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQID NO:42;

iii) uma região variável da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:107 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:57; e

iv) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:119 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:73.

2. Um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1, compreendendo uma região variável de cadeia pesada tendo a sequência de

aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:90 e uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:43.

3. O anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio da reivindicação 1 ou da reivindicação 2, compreendendo ainda uma região constante de IgG4 tendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:40 e uma região constante de cadeia capa tendo a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:41.

4. Uma composição farmacêutica, compreendendo um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

5. Um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para usar como um medicamento.

6. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para usar no tratamento de uma doença fibrótica num ser humano.

7. Um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para usar no tratamento de uma doença crónica renal num ser humano.

8. Um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para usar em terapia de combinação para o tratamento de uma doença fibrótica num ser humano, em que o referido anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio é administrado em combinação com um inibidor ACE.

9. Um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para usar em terapia de combinação para o tratamento de uma doença renal crónica num ser humano, em que o referido anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio se destina a ser administrado em combinação com um inibidor ACE.

10. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para usar no tratamento de cancro.

Lisboa, 29 de Abril de 2011

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 2005010049 A
- WO 9201047 A
- EP 0945464 A
- US 5939598 A
- WO 209317715 A
- WO 9208802 A
- WO 9100360 A
- WO 9205793 A
- US 4474893 A
- US 4714681 A
- US 4825648 A
- US 5573920 A
- US 5601819 A
- WO 9208495 A
- WO 9114438 A
- WO 8912624 A
- US 5314995 A
- EP 396387 A
- WO 92122324 A
- US 4946778 A
- US 5258498 A
- US 5585069 A
- WO 8605807 A
- WO 8901036 A
- US 5122454 A
- WO 93121232 A
- EP 439095 A
- US 5474981 A
- US 5336603 A
- US 5622929 A
- US 5359046 A
- US 5348053 A
- US 5447851 A
- US 5112946 A
- EP 307434 A
- EP 367166 A
- WO 9804368 A
- WO 9106570 A
- EP 394827 A
- EP 232262 A
- US 4741900 A
- US 4391904 A
- WO 9622024 A
- WO 99104913 A
- US 4957760 A
- US 5206344 A
- US 5225212 A
- WO 9164751 A
- US 20020098189 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- Attisano; Lee-Hoeflich. *Gen. Biol.*, 2001, vol. 2, 30101
- Moustakas et al. *J. Cell Sci.*, 2001, vol. 114, 4359
- Wrasa. *Cell*, 2000, vol. 100, 189
- Roberts; Sporn. *Peptide Growth Factors and Their Receptors*. Springer-Verlag, 1990, 419-72
- Massagué, J. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, vol. 67, 753
- Bottinger. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002, vol. 13, 2600
- Yu. *Kid. Int.*, 2003, vol. 64, 844
- Hudson; Souriau. *Nature Medicine*, 2003, vol. 9, 129-34
- Chothia; Lesk. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-17
- Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. US Department of Health and Human Services, 1967
- Chothia. *J. Mol. Biol.*, vol. 196, 901-17
- MacCallum. *J. Mol. Biol.*, vol. 262, 732-45
- Marks et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 779-83
- Annes et al. *J. Cell Science*, 2003, vol. 116, 217-24
- Miyazono et al. *Growth Factors*, 1993, vol. 8, 11-22
- Munger et al. *Kidney Int.*, 1997, vol. 51, 1376-82
- Okiu; Hesketh. *Biochem. J.*, 2000, vol. 352, 601-10
- Talpale et al. *Adv. Cancer Res.*, 1996, vol. 75, 87-134
- G. Tribbick. *Journal of Immunological Methods*, 2002, vol. 257, 27-35
- Woods; Hamuro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2001, vol. 37, 89-98
- Karlsson et al. *J. Immunol. Methods*, 1991, vol. 145, 299-340

- Jonsson et al. *Ann. Biol. Clin.*, 1993, vol. 51, 19-26
- Jonsson et al. *BioTechniques*, 1991, vol. 11, 620-7
- Johnsson et al. *J. Mol. Recognit.*, 1995, vol. 8, 125-31
- Johnson et al. *Anal. Biochem.*, 1991, vol. 196, 268-77
- Randall et al. *J. Immunol. Methods*, 1993, vol. 164, 61-67
- Morita et al. *Am. J. Kidney Dis.*, 1998, vol. 31, 559-73 [0032]
- Bagchus et al. *Lab. Invest.*, 1986, vol. 55, 680-7
- Yamamoto ; Wilson. *Kidney Int.*, 1987, vol. 32, 514-25 [0032]
- O'Donoghue et al. *J. Clin. Invest.*, 1991, vol. 68, 1522-30
- Burg et al. *Lab Invest.*, 1997, vol. 76, 505-16
- Johnson et al. *Kidney Int.*, 1995, vol. 47, 62-9
- PNAS, 2000, vol. 97, 8015-20
- Diabetes, 1996, vol. 45, 522-30
- Ueberham et al. *Hepatology*, 2003, vol. 37 (5), 1067-78
- Tutt et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60-69
- Kostelny et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1547-1553
- Harlow ; Lane. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999
- Harlow ; Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988
- Breitling ; Dlibiel. *Recombinant Antibodies*. John Wiley & Sons, 1999
- H. Zola. *Monoclonal Antibodies*. Garland Press
- James W. Goding. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press
- Mullinax et al. *BioTechniques*, 1992, vol. 12 (8), 964-9
- Sawai et al. *AJRI*, 1995, vol. 34, 26-34
- Better et al. *Science*, 1986, vol. 240, 1041-3
- Huston et al. *Methods in Enzymology*, 1991, vol. 203, 48-68
- Shu et al. *PNAS USA*, 1993, vol. 90, 7995-9
- Skerra et al. *Science*, 1986, vol. 240, 1038-40
- Riechmann et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323
- Kutmaier et al. *BioTechniques*, 1994, vol. 17, 242
- Current Protocols In Molecular Biology. John Wiley & Sons
- Chothis et al. *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 278, 457-79
- Martin ; Thornton. *Mol. Biol.*, 1996, vol. 263, 600-15, <http://www.bloint.org.uk>
- Berman et al. *Nucl. Acids Res.*, 2000, vol. 28 (1), 235-42
- Routledge et al. *Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man*. Academic Titles, 1993, 14-44
- B. Lo. *Antibody Engineering: Methods and Protocols*. Humana Press, 2004
- Presta et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623-32
- Couto et al. *Hybridoma*, 1994, vol. 13, 215-9
- Couto et al. *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 5973s-7s
- Werther et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 157, 4986-95
- O'Connor et al. *Protein Engng*, 1998, vol. 11, 321-8
- Bird. *Science*, 1988, vol. 242, 423-42
- Huston et al. *PNAS*, 1988, vol. 65, 5679-5683
- Ward et al. *Nature*, 1989, vol. 334, 544-54
- Skews et al. *Science*, 1986, vol. 242, 1038-1041
- Phizicky et al. *Microbial. Rev.*, 1985, vol. 59, 94-123
- Foecking et al. *Gene*, 1986, vol. 45, 101
- Cockett et al. *BioTechnology*, 1990, vol. 8, 2
- Ruther et al. *EMBO J.*, 1983, vol. 2, 1791
- Inouye ; Inouye. *Nucleic Acids Res.*, 1985, vol. 13, 3 101-3 103
- Van Hecke ; Schuster. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 24, 5503-5509
- Logan ; Shank. *PNAS*, 1984, vol. 8 (1), 365-9
- Bittner et al. *Methods in Enzymol.*, 1987, vol. 153, 5 1-4
- Naramura et al. *Immunol. Lett.*, 1994, vol. 39, 91-9
- Gillies et al. *PNAS*, 1982, vol. 69, 1428-32
- Fell et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 146, 2446-52
- Ashkenazi et al. *PNAS*, 1991, vol. 68, 10535-10539
- Zheng et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 154, 5590-5600
- Vis et al. *PNAS*, 1992, vol. 69, 11337-11341
- Trautnecker et al. *Nature*, 1988, vol. 33 (1), 84-86
- Bennett et al. *J. Molecular Recognition*, 1995, vol. 6, 52-58
- Johansson et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 9459-9471
- Gentz et al. *PNAS*, 1989, vol. 86, 821-824
- Wilson et al. *Cell*, 1984, vol. 37, 767
- Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy. Amon et al. *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc. 1985, 243-56
- Antibodies For Drug Delivery. Hellstrom et al. *Controlled Drug Delivery*. Marcel Dekker, Inc. 1987, 623-53

- Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy; A Review. **Thorpe et al.** Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications. 1985, 475-506
- Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy. Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy. Academic Press, 1985, 303-16
- **Thorpe et al.** The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates. *Immunol. Rev.*, 1982, vol. 62, 119-58
- Basic and Clinical Immunology. 1991
- Enzyme Immunoassay. CRC Press, 1980
- **Gosling J P.** Immunoassays: A Practical Approach (Practical Approach Series). Oxford Univ Press, 2000
- **Diamandis ; Christopoulos.** Immunoassay. Academic Press, 1996
- Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. **Tijjan.** Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Science Publishers B.V, 1985
- The Immunoassay Handbook. Nature Pub Group, 2001
- **James T. Wu.** Quantitative Immunoassay: A Practical Guide for Assay Establishment, Troubleshooting, and Clinical Application. Amer Assn for Clinical Chemistry, 2000
- Manual of Immunological Methods. CRC Press
- **Harlow ; Lane.** Antibodies, A Laboratory Manual
- Immunoassay: A Practical Guide. Academic Press, 1987
- Principles and Practice of Immunoassays. Stockton Press, 1991
- Non-isotopic Immunoassays. Plenum Press, 1988
- Basic and Clinical Immunology
- Enzyme Immunoassay
- **Harlow ; Lane.** Using Antibodies, A Laboratory Manual
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1994, vol. 1
- **Needleham et al.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443-453
- **Sankoff et al.** Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison. Addison-Wesley, 1983
- **Trautenecker et al.** *Nature*, 1988, vol. 331, 84-8
- **Fountoulakis et al.** *J. Biochem.*, 1995, vol. 15 (270), 2958-64
- **Freifelder.** Physical Biochemistry. W.H. Freeman & Co, 1982
- **Cantor ; Schimmel.** Biophysical Chemistry parts 1-3. W.H. Freeman & Co, 1980
- **Smith ; Waterman.** *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 462
- **Neediman ; Wunsch.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443
- **Pearson ; Lipman.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1968, vol. 65, 2444
- *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, W37-40
- *Nucleic Acids Res.*, 01 July 2003, vol. 31 (13), 3503-6
- *Pharmacogenomics*, January 2002, vol. 3 (1), 131-4
- **Peruski ; Peruski.** The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research. ASM Press, inc, 1997
- Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins. Methods in Gene Biotechnology. CRC Press, inc, 1997, 123-151
- Guide to Human Genome Computing. Academic Press, inc, 1998
- **Ron et al.** *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 268, 2984-8
- **Bowie et al.** *Scienza*, 1990, vol. 247, 1306-1310
- **Pinckard et al.** *Clin. Exp. Immunol.*, 1967, vol. 2, 331-340
- **Robbins et al.** *Diabetes*, 1987, vol. 36, 838-845
- **Cleland et al.** *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1993, vol. 10, 307-377
- **Border et al.** *Nature*, 1990, vol. 346, 371-4
- **Giri et al.** *Thorax*, 1993, vol. 48, 959-68
- The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Merck & Co,
- **Thorn et al.** Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill
- Clinical Immunology; Principles and Practice. Mosby
- **Spilker.** Guide to Clinical Studies and Developing Protocols. Raven Press Books, Ltd, 1984, 7-1354-60
- **Spilker.** Guide to Clinical Trials. Raven Press, Ltd, 1991, 93-101
- Modern Pharmacology. Little, Brown and Co, 1986, 127-33
- Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics. Williams and Wilkins, 1987, 50-56
- **Tallarida et al.** Principles in General Pharmacology. Springer-Verlag, 1988, 16-20
- The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics. **Mordenti ; Chappell et al.** Toxicokinetics and New Drug Development. Pergamon Press, 1989
- Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics. Pergamon Press, 1990
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1990

- Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications. Dekker, 1993
- Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. Dekker, 1990
- Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems. Dekker, 1990
- E.W. Martin. Remington's Pharmaceutical Sciences
- Hormones, autocoids and the kidney. **Rocco ; Ziyadeh**. Contemporary issues in Nephrology. Churchill Livingstone, 1991, vol. 23, 391-410
- **Roberts et al.** *Rec. Prog. Hormone Res.*, 1988, vol. 44, 157-97
- **Sharma ; Ziyadeh**. *Semin Nephrol.* 1997, vol. 17, 80-92
- **Sharma ; Ziyadeh**. *Kidney Int.* 1995, vol. 51, 34-6
- **Heino et al.** *J Biol Chem.* 1989, vol. 264, 350-8
- **Reihman et al.** *PNAS*, 1991, vol. 88, 6805-9
- **Kim et al.** *Mol Cell Biol.* 1990, vol. 10, 1492-7
- **Spurgeon et al.** *Am. J Physiol Renal Physiol.* 2005, vol. 288, F568-F577
- **Ziyadeh**. *Cur. Pract. Med.*, 1998, vol. 1, 87-9
- **Wolf ; Ziyadeh**. *Kidney Int.* 1999, vol. 56, 393-405
- **Wolf et al.** *Am J Pathol.* 2001, vol. 158, 1091-1100
- **Wolf et al.** *Diabetologia*, 1999, vol. 42, 1425-32
- **Wolf et al.** *Am J Physiol.* 1997, vol. 273, F348-56
- **Liu ; Praisig**. *Am J Physiol.* 1999, vol. 277, F186-94
- **Ziyadeh**. *Cur Proc Med.* 1998, vol. 1, 87-89
- **Border et al.** *Kidney Int.*, 1990, vol. 37, 689-695
- **Mauer et al.** *J. Clin. Invest.*, 1984, vol. 74, 1143-1155
- **Yamamoto et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, vol. 90, 1814-1818
- **Phan et al.** *Kidney Int.*, 1990, vol. 37, 426
- **Okuda et al.** *J. Clin. Invest.*, 1990, vol. 86, 453
- **Border et al.** *Nature*, 1990, vol. 346, 371
- **Border et al.** *Nature*, 1992, vol. 360, 361-363
- **Border ; Noble**. *N. Engl. J. Med.*, 1994, vol. 331, 1288-92
- **Border et al.** *Semin. Nephrol.*, 1989, vol. 9, 307-17
- **Han et al.** *Am. J Physiol Renal Physiol.* 2000, vol. 278, F828-34
- **Ziyadeh et al.** *PNAS*, 2003, vol. 97, 8015-20
- **Li ; Friedman**. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1999, vol. 14, 618-33
- **Gressner et al.** *Front Biosci.*, 2002, vol. 7, d793-807
- **Schuppan et al.** *Cell Death Differ.*, 2003, vol. 10 (1), 59-67
- **Kanzler et al.** *Am. J. Physiol.*, 1999, vol. 276, G1059-68
- **Sanderson et al.** *PNAS*, 1995, vol. 92, 72-76
- **George et al.** *PNAS*, 1999, vol. 96, 19-24
- **Qi et al.** *PNAS*, 1999, vol. 96, 45-49
- **Wu ; Zern**. *J. Gastroenterol.*, 2000, vol. 35, 665-72
- **Giri et al.** *Thorax*, 1993, vol. 48, 958-966
- **Holgate et al.** *Int Arch Allergy Immunol.* 2001, vol. 124 (1-3), 253-6
- **Khalil et al.** *Thorax*, 2001, vol. 56 (12), 907-15
- **Lecart et al.** *Biol Neonate*, 2000, vol. 77 (4), 217-23
- **Pulley et al.** *Hum Genet.* 2001, vol. 109 (6), 623-7
- **Sagara et al.** *J Allergy Clin Immunol.* 2002, vol. 110 (2), 248-54
- **Sheppard**. *Chest*, 2001, vol. 120 (1), 49S-53S
- **Strieter**. *Chest*, 2001, vol. 120 (1), 77S-85S
- **Tofi et al.** *Pediatr Pulmonol.* 1997, vol. 24 (1), 22-8
- **Kelly et al.** *Cur. Pharm. Des.*, 2003, vol. 9, 3949
- **Kaminski et al.** *PNAS*, 2000, vol. 97, 1778-83
- **T.A. McCaffrey**. *TGF- β s and TGF- β Receptors in Atherosclerosis. Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2000, vol. 11, 103-114
- **Schultz et al.** *J Clin Invest.*, 2002, vol. 109 (6), 787-86
- **Brand ; Schneider**. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1995, vol. 27, 518
- **Wolf et al.** *J. Clin. Invest.*, 1994, vol. 93, 1172-8
- **Nabel et al.** *PNAS*, 1993, vol. 90, 10759-63
- **Border ; Ruoslahti**. *J Clin Inv.* 1992, vol. 90, 1-7
- **Border ; Noble**. *N. Engl J Med.* 1994, vol. 331, 1286-91
- **Moreland, R.** *Int J Impot Res.* 1998, vol. 10, 113-20
- **Wahl et al.** *J. Exp. Medicine*, 1993, vol. 177, 225-30
- **Cordeiro MF.** *Clin Sci (Lond)*, 2003, vol. 104 (2), 181-7
- **Sullivan et al.** *J Pediatr Surg.* 1995, vol. 30, 198-203
- **Shah et al.** *Lancet*, 1992, vol. 339, 213-4
- **Shah et al.** *J. Cell Science*, 1994, vol. 107, 1137-57
- **Shah et al.** *J Cell Sci.* 1995, vol. 108, 985-1002
- **Choi et al.** *Immunol Cell Biol.* 1996, vol. 74, 144-50
- **Huang et al.** *FASEB J*, 2002, vol. 16, 1269-70
- **Werner ; Grosse**. *Physiol Rev.* 2003, vol. 83 (3), 635-70

- Strober et al. *Immunol. Today*, 1997, vol. 18, 81-4
- Neurath et al. *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 2605-16
- Ludviksson et al. *J. Immunol.*, 1997, vol. 159
- Boirivant et al. *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 185, 1929-39
- Powrie et al. *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 2669-74
- Lotz et al. *J. Immunol.*, 1990, vol. 144, 4183-94
- van Beuningen et al. *Lab. Invest.*, 1994, vol. 71, 273-90
- Hamilton et al. *PNAS*, 1991, vol. 88, 7180-4
- Scharstuhl et al. *Immunol.*, 2002, vol. 169, 507-14
- Derynck et al. *Nat. Genet.*, 2001, vol. 29, 117-29
- Cui et al. *Cell*, 1996, vol. 86, 531-42
- Derynck et al. *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 707-12
- Dickson et al. *PNAS*, 1987, vol. 84, 837-41
- Akhurst ; Derynck. *Trends Cell Biol.*, 2001, vol. 11, 44-51
- Tsushima et al. *Gastroenterology*, 1996, vol. 110, 375-82
- Adler et al. *J. Urol.*, 1999, vol. 161, 182-7
- Steiner ; Barrack. *Mol. Endocrinol.*, 1992, vol. 6, 15-25
- Arteaga et al. *Cell Growth and Differ.*, 1993, vol. 4, 193-201
- Wikstrom, P. et al. *Prostate*, 1998, vol. 37, 19-29
- Saito, H. et al. *Cancer*, 1999, vol. 86, 1455-62
- Kasid et al. *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 5733-6
- Daly et al. *J. Cell Biochem.*, 1990, vol. 43, 199-211
- Barrett-Lee et al. *Br. J. Cancer*, 1990, vol. 61, 612-7
- King et al. *J. Steroid Biochem.*, 1989, vol. 34, 133-5
- Welch et al. *PNAS*, 1990, vol. 87, 7678-82
- Walker et al. *Eur. J. Cancer*, 1992, vol. 28, 841-4
- Butta et al. *Cancer Res.*, 1982, vol. 52, 4261-4
- Thompson et al. *Br. J. Cancer*, 1991, vol. 63, 609-14
- Arteaga et al. *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 92, 2568-76
- Wallick et al. *J. Exp. Med.*, 1990, vol. 172, 1777-84
- Anscher et al. *N. Engl. J. Med.*, 1993, vol. 328, 1592-8
- Goralik ; Flavell. *Nature Medicine*, 2001, vol. 7 (10), 1115-22
- Garba et al. *J. Immunology*, 2002, vol. 168, 2247-54
- Cui et al. *Cell*, 1996, vol. 86 (4), 531-42
- Wikstrom et al. *Scand J Urol Nephrol.*, 2000, vol. 34 (2), 85-94
- Lim. *Mech Ageing Dev.*, 2003, vol. 124 (5), 697-708
- Lu et al. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64 (13), 4405-10
- Letterio ; Roberts. Regulation of the immune response by TGF Beta. *Ann Rev Immunol*, 1998, vol. 16, 137-61
- Logan et al. *Eur. J. Neurosci.*, 1994, vol. 6, 355-63
- Masliah et al. *Neurochemistry International*, 2001, vol. 39, 393-400
- Buckwalter et al. *Ann NY Acad Sci.*, 2002, vol. 977, 87-95
- Chaturvedi et al. *Diabetes Care*, 2002, vol. 25, 2320-7
- Rastinejad et al. *Cell*, 1989, vol. 58, 345-355
- Moses et al. *Biotech.*, 1991, vol. 9, 630-634
- Folkman et al. *N. Engl. J. Med.*, 1995, vol. 333, 1757-63
- Auerbach et al. *J. Microvasc. Res.*, 1985, vol. 29, 401-11
- Folkman. *Advances in Cancer Research*. Academic Press, 1985, 175-263
- Patz. *Am. J. Ophthalmol.*, 1982, vol. 94, 715-43
- Folkman et al. *Science*, 1983, vol. 221, 719-25
- Roberts et al. *PNAS*, 1986, vol. 83, 4167-71
- Madri et al. *J. Cell Biol.*, 1988, vol. 106, 1375-84
- Yang ; Moses. *J. Cell Biol.*, 1990, vol. 111, 731-74
- Gajdusek et al. *J. Cell. Physiol.*, 1993, vol. 157, 133-44
- Choi ; Ballermann. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 21144-50
- *Bull Acad Natl Med.*, 2000, vol. 184 (3), 537-44
- Folkman ; Klagsbrun. *Science*, 1987, vol. 235, 442-7
- Fishman et al. *Medicine*. J. B. Lippincott Co, 2002
- Barral-Netto et al. *Science*, 1992, vol. 257, 545-7
- Inui et al. *FASEB J.*, 2002, vol. 16 (14), 1967-9
- Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 2001
- Ausubel et al. *Biology*. Greene Publishing Associates
- Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley/Greene, 1987
- Bartlett ; Stirling. *PCR Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2003, vol. 226

- **Deutscher**, Guide to Protein Purification. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 182
- **Coligan et al.** Current Protocols in Protein Science. John Wiley and Sons, 1995
- A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing. Academic Press, 1993
- **Hochuli**, *Chemische Industrie*, 1989, vol. 12, 69-70
- Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent. **Hochuli**, *Genetic Engineering, Principle and Methods*, Plenum Press, 1990, vol. 12, 87-98
- **Crowe et al.** QIAexpress: The High Level Expression and Protein Purification System. QIAGEN, Inc, 1992
- **Weir's**, Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Science, 1996, vol. 1-4
- Current Protocols in Immunology. Wiley/Greene, 2004
- *Methods in Enzymology*. Elsevier, vol. 70, 73.
- **Wu et al.** *PNAS*, 1998, vol. 95, 6037-42
- **Watkins**, *Methods Mol. Biol.*, 2002, vol. 178, 187-93
- **Kunkel**, *PNAS*, 1965, vol. 82, 488-92
- **Watkins et al.** *Anal Biochem*, 1998, vol. 256, 169-77
- **Tsang et al.** *Cytokine*, 1995, vol. 7, 389-97
- **Arias et al.** *BMC Gastroenterology*, 2003, vol. 3 (29)
- **Pittet et al.** *JCI*, 2001, vol. 107, 1537-1544
- **Bellum et al.** *Am. J. Pathol*, vol. 150, 2243
- **London et al.** *Clin. Immunol.*, vol. 103, 284
- **London et al.** *Exp Mol Pathol*, vol. 72, 24-36
- *Nat Struct Biol.*, 2002, vol. 3, 203-8