

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2007.08.14	(73) Titular(es): XENCOR INC.
(30) Prioridade(s): 2006.08.14 US 822362 P	111 W. LEMON AVENUE MONROVIA, CA 91016 US
(43) Data de publicação do pedido: 2011.11.02	(72) Inventor(es):
(45) Data e BPI da concessão: 2013.01.16 072/2013	MATTHEW J. BERNETT US SEUNG YUP CHU US JOHN R. DESJARLAIS US SHER BAHADUR KARKI US GREGORY ALAN LAZAR US
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS OTIMIZADOS QUE VISAM CD**

(57) Resumo:

A PRESENTE DIVULGAÇÃO DESCREVE ANTICORPOS QUE VISAM CD19, EM QUE OS ANTICORPOS COMPREENDEM PELO MENOS UMA MODIFICAÇÃO EM RELAÇÃO A UM ANTICORPO PARENTE, EM QUE A MODIFICAÇÃO ALTERA A AFINIDADE PARA UM FCGGR OU ALTERA A FUNÇÃO EFETORA EM COMPARAÇÃO COM O ANTICORPO PARENTE. SÃO TAMBÉM DIVULGADOS MÉTODOS PARA USO DOS REFERIDOS ANTICORPOS.

RESUMO**"ANTICORPOS OTIMIZADOS QUE VISAM CD 19"**

A presente divulgação descreve anticorpos que visam CD19, em que os anticorpos compreendem pelo menos uma modificação em relação a um anticorpo parente, em que a modificação altera a afinidade para um FcγR ou altera a função efetora em comparação com o anticorpo parente. São também divulgados métodos para uso dos referidos anticorpos.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS OTIMIZADOS QUE VISAM CD 19"

ANTECEDENTES

Células B

As células B são linfócitos que desempenham um papel importante na resposta imune humoral. São produzidas na medula óssea da maioria dos mamíferos, e representam 5-15% do conjunto de circulação linfóide. A principal função das células B é produzir anticorpos contra vários antígenos, e são um componente essencial do sistema imune adaptativo.

O corpo humano produz milhões de tipos diferentes de células B por dia que circulam no sangue e linfa desempenhando um papel de vigilância imunológica. As células B, também referidas como linfócitos B, não produzem anticorpos até que se tornem plenamente ativadas. Cada célula B tem uma única proteína recetora (referida como a recetora das células B (RCB)) na sua superfície que se irá ligar a um antígeno particular. O RCB é uma imunoglobulina ligada a membrana, e é esta molécula que permite a distinção das células B dos outros tipos de linfócitos, assim como é o principal recetor envolvido na ativação das células B. Um vez que as células B encontram o seu antígeno cognato e recebe um sinal adicional da célula T auxiliar, pode diferenciar-se ainda mais nos vários tipos de células B listados a seguir. As células B podem tornar-se ou um desses tipos de células diretamente ou pode sofrer um passo de diferenciação intermédio, a reação de centro germinativo, em que as células B irá hípermutar a região

variável do seu gene de imunoglobulina e possivelmente submetidos a mudança de classe.

O desenvolvimento das células B ocorre através de várias fases, cada fase representando uma mudança no conteúdo genómico nos loci de anticorpos. As fases de desenvolvimento das células B incluem células B Progenitoras, Pró-células B Precoces, Pro-células B Tardias, Pré-células B Grande, Pré-células B Pequenas, células B Imaturas, e células B Maduras.

As células B maduras podem ser divididas em quatro tipos principais:

As células B-1 expressam CD5, um marcador usualmente encontrado nas células T. As células B-1 também expressam IgM em quantidades maiores que IgG. Segregam anticorpos polireativos naturais de baixa afinidade encontrados no soro e frequentemente têm especificidades direcionadas para os próprios antigénios, e polissacáridos bacterianos comuns. As células B-1 estão presentes em baixo número nos nódulos linfáticos e no baço e, em vez disso, são encontrados predominantemente nas cavidades peritoniais e pleurais. As células B-2 são as células B convencionais às quais muitos textos se referem. Residem na medula óssea, baço, e nódulos linfáticos. São de curta duração; e quando desencadeadas por antigénios podem diferenciar-se em células B de memória produtoras de IgG. No decurso destas respostas de anticorpo a IgG pode sofrer uma substancial maturação de afinidade.

As células B plasmáticas (também conhecidas como células plasmáticas) são células B grandes que foram expostas a

antigénio e produzem e segregam grandes quantidades de anticorpos, que auxiliam na destruição de micróbios ao ligarem e facilitarem o direcionamento pelos fagócitos, assim como a ativação do sistema de complemento. As células plasmáticas são por vezes referidas como fábricas de anticorpos.

As células B de memória são formadas a partir de células B ativadas que são específicas para o antigénio encontrado durante a resposta imune primária. Estas células vivem durante muito tempo, e podem responder rapidamente a seguir a uma segunda exposição ao mesmo antigénio.

Quando as células B falham em qualquer passo do processo de maturação, estas morrerão através de um mecanismo chamado de apoptose. Se reconhecem o seu próprio antigénio durante o processo de maturação, as células B ficarão suprimidas (conhecido como anergia) ou sofrem apoptose. As células B são produzidas continuamente na medula óssea, mas somente uma pequena porção de células B recentemente formadas sobrevive para participar no conjunto de células B periféricas de vida longa.

Nos anos recentes, surgiram dados sugerindo que os linfócitos B desempenham um papel mais vasto nas respostas imunes e não são meramente os recetores passivos de sinais que resultam em diferenciação das células plasmáticas produtoras de anticorpo. Juntamente com os seus papéis tradicionais como células que apresentam antígenos e precursoras de células plasmáticas produtoras de anticorpo, foi também observado que as células B mostraram regular também as funções das células que apresentam antigénio (CAAs) e das células T, produzir citocinas, e expressar pares recetor/ligando que previamente se tinha pensado serem limitados a outros tipos de células.

Distúrbios das células B

Devido ao seu papel crítico na regulação do sistema imune, a desregulação das células B está associada a uma diversidade de distúrbios. Os distúrbios das células B, também aqui referidos como doenças relacionadas com as células B, dividem-se em proliferação excessiva ou descontrolada (linfomas, leucemias), e defeitos de desenvolvimento das células B/produção de imunoglobulina (imunodeficiências). A maioria (80%) dos casos de linfoma tem origem nas células B. Estes incluem linfoma não-Hodgkin (LNH.), leucemia linfoblástica aguda (LLA), e doenças autoimunes relacionadas.

O LNH é uma malignidade heterogénea com origem nos linfócitos. Nos Estados Unidos (U.S.), a incidência é estimada em 65.000/ano com mortalidade de aproximadamente 20.000 (American Cancer Society, 2006; e SEER Cancer Statistics Review). A doença pode ocorrer em todas as idades, o surgimento habitual começa em adultos acima dos 40 anos, com a incidência a aumentar com a idade. O LNH é caracterizado por uma proliferação clonal de linfócitos que se acumulam nos nódulos linfáticos, sangue, medula óssea e baço, embora qualquer órgão importante possa estar envolvido.

O diagnóstico e caracterização histológica do LNH são feitos usando uma combinação de critérios morfológicos e de imunofenotipos. O sistema de classificação corrente usado pelos patologistas e clínicos é a Classificação de Tumores da Organização Mundial de Saúde (OMS), o qual organiza o LNH em célula B precursora e madura ou neoplasias das células T. O PD correntemente divide o LNH em indolente ou agressivo para entrada em ensaios clínicos. Para consistência do presente documento será também usada uma

divisão similar. O grupo de LNH indolente é composto primariamente por subtipos foliculares, linfoma linfocítico de pequenas células, MALT, e zona marginal; o indolente engloba aproximadamente 50% de doentes de LNH de célula B diagnosticados de novo. O LNH agressivo inclui doentes com diagnóstico histológico de células B grandes primariamente difusas (40% de todos os doentes diagnosticados de novo têm células grandes difusas), de Burkitt, e células do manto.

O percurso clínico do LNH é altamente variável. Um dos determinantes principais é o subtipo histológico. Os tipos de LNH mais indolentes são considerados como sendo doença incurável. Os doentes respondem inicialmente quer à quimioterapia quer à terapia por anticorpo mas a maioria irá recidivar. Os estudos até à data não demonstraram uma melhoria na sobrevivência coma intervenção precoce. Em doentes assintomáticos, é aceitável "observar e esperar" até que o doente se torne sintomático ou a ritmo doença parecer estar a acelerar. Ao longo do tempo, a doença pode transformar-se numa histologia mais agressiva. A média de sobrevivência é 8 até 10 anos, e os doentes indolentes frequentemente recebem 3 ou mais tratamentos durante a fase de tratamento da sua doença. O tratamento inicial de um doente de LNH indolente sintomático historicamente tem sido a combinação de quimioterapia. Os agentes mais comumente usados incluem: ciclofosfamida, vincristina e prednisona (CVP); ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona (CHOP); ou o análogo da purina, fludarabina. Aproximadamente 70% a 80% dos doentes irá responder à sua quimioterapia inicial, e duração das remissões últimas na ordem de 2-3 anos. Em última análise, a maioria dos doentes recidiva. A descoberta e o uso clínico do anticorpo anti-CD20, rituximab, proporcionou melhorias significativas na resposta e na taxa de sobrevivência. O padrão de tratamento atual para a maioria dos doentes é rituximab + CHOP (R-

CHOP) ou rituximab + CVP (R-CVP). O interferon está aprovado para tratamento inicial do LNH em combinação com agentes de alquilação, mas tem uso limitado nos U.S.

A terapia com rituximab tem mostrado ser eficaz em vários tipos de LNH, e está atualmente aprovada como um tratamento de primeira linha tanto para LNH indolente (linfoma folicular) como agressivo (linfoma das células B grande difuso). Porém, há limitações significativas do anticorpo monoclonal anti-CD20 (mAb), incluindo resistência primária (50% de resposta em doentes indolentes com recidiva), resistência adquirida (50% de taxa de resposta após retratamento), resposta completa rara (2% de taxa de resposta completa em população com recidiva), e um padrão continuado de recidiva. Finalmente, muitas células B não expressam CD20, e assim muitas doenças das células B não são tratáveis usando a terapia de anticorpo anti-CD20. Anticorpos contra antígenos, outros para além do CD20, podem ter efeitos antilinfoma que podem ultrapassar a resistência anti-CD20 ou aumentar a atividade da terapia anti-CD20.

Para além do LNH existem vários tipos de leucemias que resultam da desregulação das células B. A leucemia linfocítica crónica (também conhecida como "leucemia linfóide crónica" ou "da célula"), é um tipo de leucemia de adulto causada por uma acumulação anormal de linfócitos B. Em LLC, os linfócitos malignos podem parecer normais e maduros, mas não são capazes de lidar de forma eficaz com a infeção. A LLC é a forma mais comum de leucemia em adultos. Os homens são duas vezes mais propensos a desenvolver LLC que as mulheres. No entanto, o fator de risco chave é a idade. Mais de 75% dos novos casos são diagnosticados em doentes com idade acima dos 50. Mais de 10.000 casos são diagnosticados todos os anos e a mortalidade é praticamente

5.000 por ano (American Cancer Society, 2006; e SEER Cancer Statistics Review).

A LLC é uma doença incurável mas que progride lentamente na maioria dos casos. Muitas pessoas com LLC levam uma vida normal e ativa durante muitos anos. Devido ao seu início lento, as fases iniciais de LLC não são geralmente tratados uma vez que se acredita que a intervenção precoce de LLC não aumenta o tempo de sobrevida ou a qualidade de vida. Em vez disso, a condição é monitorizada ao longo do tempo. Os tratamentos iniciais de LLC variam dependendo no diagnóstico exato e da progressão da doença. Existem dezenas de agentes usados para a terapia de LLC. Embora o análogo da purina fludarabina mostra dar taxas de resposta superiores ao clorambucilo como terapia primária, não há evidência que o uso precoce da fludarabina aumenta a sobrevida global. A combinação dos regimes de quimioterapia tais como fludarabina com ciclofosfamida, FCR (fludarabina, ciclofosfamida e rituximab) e CHOP são eficazes tanto em novos diagnosticados ou em LLC recidivados. O transplante da medula óssea alogénica (células estaminais) é raramente usado como um tratamento de primeira linha para LLC devido ao seu risco.

A LLC "refratária" é uma doença que já não responde favoravelmente ao tratamento. Neste caso são consideradas as terapias mais agressivas, incluindo o transplante de medula óssea (células estaminais). O anticorpo monoclonal alemtuzumab, direcionado contra CD52, pode ser usado em doentes com doença refratária baseada na medula óssea.

Um outro tipo de leucemia é a leucemia linfoblástica aguda (LLA), também conhecida como leucemia linfocítica aguda. A LLA é caracterizada pela sobreprodução e multiplicação contínua de glóbulos brancos imaturos e malignos (também

conhecidos como linfoblastos) na medula óssea. 'Aguda' refere-se a estado imaturo, indiferenciado, de linfócitos em circulação ("blastos"), e em que a doença progride rapidamente com expectativa de vida de semanas a meses, se não tratada. A LLA é a mais comum na infância com um pico de incidência aos 4-5 anos de idade. As crianças de 12-16 anos de idade morrem mais facilmente desta do que as outras. Atualmente, pelo menos 80% de crianças com LLA são consideradas curáveis. Menos de 4.000 casos são diagnosticados todos os anos e a mortalidade é quase 1.500 por ano (American Cancer Society, 2006; e SEER Cancer Statistics Review).

A autoimunidade resulta de uma rutura da autotolerância envolvendo mecanismos imunes humorais e/ou mediados por célula. Entre as consequências da falha na tolerância central e/ou periférica, são a sobrevivência e a ativação das células B e células T auto reativas. Exemplos de doenças autoimunes incluem, por exemplo, artrite reumatóide (RA), sistema de lúpus eritematoso (SLE ou lúpus), esclerose múltipla, Síndrome de Sjogren, e púrpura trombocitopénia idiopática (PTI). A patogénese da maioria das doenças autoimunes está ligada à produção de auto-anticorpos contra antígenos próprios, conduzindo a uma diversidade de patologias associadas. Os autoanticorpos são produzidos por células plasmáticas terminalmente diferenciadas que são derivadas de células B naïves ou de memória. Além disso, as células B podem ter outros efeitos na patologia autoimune, como células apresentando antígeno (CAAs) que pode interagir com e estimular as células T auxiliares, estimulando adicionalmente o ciclo da resposta imune anti-própria. A depleção das células B pode ter impacto direto na produção de autoanticorpos. De facto, o tratamento da RA e SLE com as terapias de depleção das células B tais como Rituxan foi demonstrado ter benefício

clínico para as duas classes de doença (Edwards & Cambridge, Nat. Rev. Immunol. 2006; Dass et al., Future Rheumatol. 2006; Martin & Chan, Annu. Rev. Immunol. 2006).

Infelizmente, não se sabe a priori quais os mecanismos de ação que podem ser ótimos para um dado antígeno alvo. Além disso, não são conhecidos quais os anticorpos que podem ser capazes de mediar um dado mecanismo de ação contra uma célula alvo. Em alguns casos uma falta de atividade de anticorpo, tanto mediado por Fv como mediado por Fc, pode ser devido ao direcionamento de um epítipo no antígeno alvo que é fraco para mediar essa atividade. Noutros casos, o epítipo alvo pode ser propício a uma desejada atividade mediada por Fv ou mediada por Fc, mas a afinidade (afinidade da região Fv para antígeno ou afinidade da região Fc para os recetores Fc) pode ser insuficiente. No sentido de resolver este problema, a presente invenção descreve modificações para anticorpos anti-CD19 que forneça atividades otimizadas mediadas por Fv e Fc. Uma vasta gama de aplicações destes anticorpos otimizados é contemplada.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É aqui descrito um anticorpo que se liga a CD19, em que o referido anticorpo compreende pelo menos uma modificação na região constante em relação ao anticorpo parente.

O anticorpo descrito acima liga-se com afinidade alterada a um recetor Fc ou altera a função efetora em comparação com o anticorpo parente.

É também divulgado um anticorpo que se liga a CD19, incluindo pelo menos uma modificação na região constante em relação a um anticorpo anti-CD 19 parente, em que o

anticorpo se liga com afinidade aumentada ao Recetor de FcγRIIIa em comparação com o anticorpo parente.

Em certos aspetos, a modificação é um aminoácido. A modificação pode ser numa posição seleccionada a partir do grupo que consiste de 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, e 337, em que a numeração é de acordo com o índice EU. A modificação aminoácido pode ser uma substituição seleccionada a partir do grupo que consiste de 221 K, 221 Y, 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 227E, 227G, 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A, 233D, 233F, 233G, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233Y, 234A, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234Y, 235A, 235D, 235E, 235F, 235G, 235H, 235I, 235K, 235M, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V, 235W, 235Y, 236A, 236D, 236E, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236N, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 237D, 237E, 237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237N, 237P, 237Q, 237R, 237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F, 238G, 238H, 238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S, 238T, 238V, 238W, 238Y, 239D, 239E, 239F, 239G, 239H, 239I, 239K, 239L, 239M, 239N, 239P, 239Q, 239R, 239T, 239V, 239W, 239Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 241D, 241E, 241L, 241R, 241S, 241W, 241Y, 243E, 243H, 243L, 243Q, 243R, 243W, 243Y, 244H, 245A, 246D, 246E, 246H, 246Y, 247G, 247V, 249H, 249Q, 249Y, 255E, 255Y, 258H, 258S, 258Y, 260D, 260E, 260H, 260Y, 262A, 262E, 262F,

262I, 262T, 263A, 263I, 263M, 263T, 264A, 264D, 264E, 264F,
264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N, 264P, 264Q, 264R,
264S, 264T, 264W, 264Y, 265F, 265G, 265H, 265I, 265K, 265L,
265M, 265N, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T, 265V, 265W, 265Y,
266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F, 267H, 267I, 267K,
267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267T, 267V, 267W, 267Y,
268D, 268E, 268F, 268G, 268I, 268K, 268L, 268M, 268P, 268Q,
268R, 268T, 268V, 268W, 269F, 269G, 269H, 269I, 269K, 269L,
269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T, 269V, 269W, 269Y, 270F,
270G, 270H, 270I, 270L, 270M, 270P, 270Q, 270R, 270S, 270T,
270W, 270Y, 271 A, 271D, 271E, 271F, 271G, 271H, 271I,
271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271 R, 271 S, 271T, 271V,
271W, 271Y, 272D, 272F, 272G, 272H, 272I, 272K, 272L, 272M,
272P, 272R, 272S, 272T, 272V, 272W, 272Y, 273I, 274D, 274E,
274F, 274G, 274H, 274I, 274L, 274M, 274N, 274P, 274R, 274T,
274V, 274W, 274Y, 275L, 275W, 276D, 276E, 276F, 276G, 276H,
276I, 276L, 276M, 276P, 276R, 276S, 276T, 276V, 276W, 276Y,
278D, 278E, 278G, 278H, 278I, 278K, 278L, 278M, 278N, 278P,
278Q, 278R, 278S, 278T, 278V, 278W, 280G, 280K, 280L, 280P,
280W, 281D, 281E, 281K, 281N, 281P, 281Q, 281Y, 282E, 282G,
282K, 282P, 282Y; 283G, 283H, 283K, 283L, 283P, 283R, 283Y,
284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 285D, 285E, 285K,
285Q, 285W, 285Y, 286E, 286G, 286P, 286Y, 288D, 288E, 288Y,
290D, 290H, 290L, 290N, 290W, 291D, 291E, 291G, 291H, 291I,
291Q, 291T, 292D, 292E, 292T, 292Y, 293F, 293G, 293H, 293I,
293L, 293M, 293N, 293P, 293R, 293S, 293T, 293V, 293V, 293Y,
294F, 294G, 294H, 294I, 294K, 294L, 294M, 294P, 294R, 294S,
294T, 294V, 294W, 294Y, 295D, 295E, 295F, 295G, 295H, 295I,
295M, 295N, 295P, 295R, 295S, 295T, 295V, 295W, 295Y, 296A,
296D, 296E, 296G, 296H, 296I, 296K, 296L, 296M, 296N, 296Q,
296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F, 297G, 297H, 297I,
297K, 297L, 297M, 297P, 297Q, 297R, 297S, 297T, 297V, 297W,
297Y, 298A, 298D, 298E, 298F, 298H, 298I, 298K, 298M, 298N,
298Q, 298R, 298T, 298W, 298Y, 299A, 299D, 299E, 299F, 299G,
299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S,

299V, 299W, 299Y, 300A, 300D, 300E, 300G, 300H, 300K, 300M, 300N, 300P, 300Q, 300R, 300S, 300T, 300V, 300W, 301D, 301E, 301H, 301Y, 302I, 303D, 303E, 303Y, 304D, 304H, 304L, 304N, 304T, 305E, 305T, 305Y, 313F, 317E, 317Q, 318H, 318L, 318Q, 318R, 318Y, 320D, 320F, 320G, 320H, 320I, 320L, 320N, 320P, 320S, 320T, 320V, 320W, 320Y, 322D, 322F, 322G, 322H, 322I, 322P, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y, 323I, 324D, 324F, 324G, 324H, 324I, 324L, 324M, 324P, 324R, 324T, 324V, 324W, 324Y, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K, 325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325Y, 326E, 326I, 326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 327I, 327K, 327L, 327M, 327N, 327P, 327R, 327S, 327T, 327V, 327W, 327Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328T, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D, 329E, 329F, 329G, 329H, 329I, 329K, 329L, 329M, 329N, 329Q, 329R, 329S, 329T, 329V, 329W, 329Y, 330E, 330F, 330G, 330H, 330I, 330L, 330M, 330N, 330P, 330R, 330S, 330T, 330V, 330W, 330Y, 331D, 331F, 331H, 331I, 331L, 331M, 331Q, 331R, 331T, 331V, 331W, 331Y, 332A, 332D, 332E, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332N, 332P, 332Q, 332R, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 333A, 333F, 333H, 333I, 333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334A, 334F, 334I, 334L, 334P, 334T, 335D, 335F, 335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335N, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337E, 337H, e 337N, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

Em aspetos adicionais, a modificação de aminoácido pode ser numa posição selecionada a partir do grupo que consiste de 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336,

e 337. Em aspetos adicionais, a substituição pode ser seleccionada a partir do grupo que consiste de 221K, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225W, 227E, 227G, 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A, 233F, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233Y, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234W, 234Y, 235D, 235F, 235G, 235H, 235I, 235K, 235M, 235N, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V, 235W, 235Y, 236D, 236E, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236N, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 237D, 237E, 237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237N, 237P, 237Q, 237R, 237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F, 238G, 238H, 238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S, 238T, 238V, 238W, 238Y, 239D, 239E, 239F, 239G, 239H, 239I, 239K, 239L, 239M, 239N, 239P, 239Q, 239R, 239T, 239V, 239W, 239Y, 240M, 240T, 241D, 241E, 241R, 241S, 241W, 241Y, 243E, 243H, 243Q, 243R, 243W, 243Y, 245A, 246D, 246H, 246Y, 247G, 247V, 249H, 249Q, 249Y, 255E, 255Y, 258H, 258S, 258Y, 260D, 260E, 260H, 260Y, 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263A, 263I, 263M, 263T, 264D, 264E, 264F, 264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N, 264P, 264Q, 264R, 264S, 264T, 264W, 264Y, 265F, 265G, 265H, 265I, 265K, 265L, 265M, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T, 265V, 265W, 265Y, 266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F, 267H, 267I, 267K, 267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267V, 267W, 267Y, 268F, 268G, 268I, 268M, 268P, 268T, 268V, 268W, 269F, 269G, 269H, 269I, 269L, 269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T, 269V, 269W, 269Y, 270F, 270G, 270H, 270I, 270L, 270M, 270P, 270Q, 270R, 270S, 270T, 270W, 270Y, 271A, 271D, 271E, 271F, 271G, 271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271S, 271T, 271V, 271W, 271Y, 272F, 272G, 272H, 272I, 272K, 272L, 272M, 272P, 272R, 272S, 272T, 272V, 272W, 272Y, 274D, 274E, 274F, 274G, 274H, 274I, 274L, 274M, 274P, 274R, 274T, 274V, 274W, 274Y, 275W, 276D, 276E, 276F, 276G, 276H, 276I, 276L, 276M, 276P, 276R, 276S, 276T, 276V, 276W, 278D,

278E, 278G, 278H, 278I, 278K, 278L, 278M, 278N, 278P, 278Q,
278R, 278S, 278T, 278V, 278W, 280G, 280P, 280W, 281E, 281K,
281N, 281P, 281Y, 282G, 282P, 282Y, 283G, 283H, 283K, 283L,
283P, 283R, 283Y, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 285K, 285Q,
285W, 285Y, 286G, 286P, 286Y, 288Y, 290H, 290L, 290W, 291D,
291E, 291G, 291H, 291I, 291Q, 291T, 292D, 292E, 292T, 292Y,
293F, 293G, 293H, 293I, 293L, 293M, 293N, 293P, 293R, 293S,
293T, 293W, 293Y, 294F, 294G, 294H, 294I, 294K, 294L, 294M,
294P, 294R, 294S, 294T, 294V, 294W, 294Y, 295D, 295F, 295G,
295H, 295I, 295M, 295N, 295P, 295R, 295S, 295T, 295V, 295W,
295Y, 296A, 296D, 296E, 296G, 296I, 296K, 296L, 296M, 296N,
296Q, 296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F, 297G, 297H,
297I, 297K, 297L, 297M, 297P, 297R, 297S, 297T, 297V, 297W,
297Y, 298E, 298F, 298H, 298I, 298L, 298M, 298Q, 298R,
298W, 298Y, 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K,
299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W, 299Y,
300A, 300D, 300E, 300G, 300H, 300K, 300M, 300N, 300P, 300Q,
300R, 300S, 300T, 300V, 300W, 301D, 301E, 301Y, 302I, 303D,
303E, 303Y, 304H, 304L, 304N, 304T, 305E, 305T, 305Y, 313F,
317E, 317Q, 318H, 318L, 318Q, 318R, 318Y, 320D, 320F, 320G,
320H, 320I, 320L, 320N, 320P, 320S, 320T, 320V, 320W, 320Y,
322D, 322F, 322G, 322H, 322I, 322P, 322S, 322T, 322V, 322W,
322Y, 324D, 324F, 324G, 324H, 324I, 324L, 324M, 324P, 324R,
324T, 324V, 324W, 324Y, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H,
325I, 325K, 325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V,
325W, 325Y, 326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 327I,
327K, 327L, 327M, 327P, 327R, 327V, 327W, 327Y, 328A, 328D,
328E, 328F, 328G, 328H, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R,
328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D, 329E, 329F, 329G, 329H,
329I, 329K, 329L, 329M, 329N, 329Q, 329R, 329S, 329T, 329V,
329W, 329Y, 330E, 330F, 330H, 330I, 330L, 330M, 330N, 330P,
330W, 330Y, 331D, 331F, 331H, 331I, 331L, 331Q, 331R,
331T, 331V, 331W, 331Y, 332A, 332F, 332H, 332L, 332M, 332N,
332P, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 333F, 333H, 333I,
333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334F, 334P, 334T, 335D, 335F,

335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337H, e 337N.

Num aspeto adicional, a modificação é numa posição selecionada a partir do grupo que consiste de 221, 222, 223, 224, 225, 228, 230, 231, 232, 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 299, 302, 304, 313, 323, 325, 328, 332, 336, em que numeração de posicionamento é de acordo com o índice EU. Em aspetos adicionais, a modificação é selecionada a partir do grupo que consiste de 221K, 221Y, 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 244H, 245A, 247G, 247V, 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, -263A, 263I, 263M, 263T, 266A, 266I, 266M, 266T, 271A, 271D, 271E, 271F, 271G, 271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271S, 271T, 271V, 271W, 271Y, 273I, 275L, 275W, 281D, 281E, 281K, 281N, 281P, 281Q, 281Y, 284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 291D, 291E, 291G, 291H, 291I, 291Q, 291T, 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W, 299Y, 304D, 304H, 304L, 304N, 304T, 313F, 323I, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K, 325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328I, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 332A, 332D, 332E, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332N, 332P, 332Q, 332R, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 336E, 336K, e 336Y.

O anticorpo pode incluir adicionalmente uma segunda modificação de aminoácido numa posição selecionada a partir do grupo que consiste de 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276,

278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, e 337, em que a numeração é de acordo com o índice EU. A segunda modificação aminoácido pode ser uma substituição selecionada a partir do grupo que consiste de 221K, 221Y, 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 227E, 227G, 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A, 233D, 233F, 233G, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233Y, 234A, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234Y, 235A, 235D, 235E, 235F, 235G, 235H, 235I, 235K, 235M, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V, 235W, 235Y, 236A, 236D, 236E, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236N, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 237D, 237E, 237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237N, 237P, 237Q, 237R, 237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F, 238G, 238H, 238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S, 238T, 238V, 238W, 238Y, 239D, 239E, 239F, 239G, 239H, 239I, 239K, 239L, 239M, 239N, 239P, 239Q, 239R, 239T, 239V, 239W, 239Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 241D, 241E, 241L, 241R, 241S, 241W, 241Y, 243E, 243H, 243L, 243Q, 243R, 243W, 243Y, 244H, 245A, 246D, 246E, 246H, 246Y, 247G, 247V, 249H, 249Q, 249Y, 255E, 255Y, 258H, 258I, 258Y, 260D, 260E, 260H, 260Y, 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263A, 263I, 263M, 263T, 264A, 264D, 264E, 264F, 264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N, 264P, 264Q, 264R, 264S, 264T, 264W, 264Y, 265F, 265G, 265H, 265I, 265K, 265L, 265M, 265N, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T, 265V, 265W, 266Y, 266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F, 267H, 267I, 267K, 267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267T, 267V, 267W, 267Y, 268D, 268E, 268F, 268G, 268I, 268K, 268L, 268M, 268P, 268Q, 268R, 268T, 268V, 268W, 269F, 269G, 269H, 269I, 269K, 269L, 269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T, 269V,

269W, 269Y, 270F, 270G, 270H, 270I, 270L, 270M, 270P, 270Q,
270R, 270S, 270T, 270W, 270Y, 271A, 271D, 271E, 271F, 271G,
271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271S, 271T,
271V, 271W, 271Y, 272D, 272F, 272G, 272H, 272I, 272K, 272L,
272M, 272P, 272R, 272S, 272T, 272V, 272W, 272Y, 273I, 274D,
274E, 274F, 274G, 274H, 274I, 274L, 274M, 274N, 274P, 274R,
274T, 274V, 274W, 274Y, 275L, 275W, 276D, 276E, 276F, 276G,
276H, 276I, 276L, 276M, 276P, 276R, 276S, 276T, 276V, 276W,
276Y, 278D, 278E, 278G, 278H, 278I, 278K, 278L, 278M, 278N,
278P, 278Q, 278R, 278S, 278T, 278V, 278W, 280G, 280K, 280L,
280P, 280W, 281D, 281E, 281K, 281N, 281P, 281Q, 281Y, 282E,
282G, 282K, 282P, 282Y, 283G, 283H, 283K, 283L, 283P, 283R,
283Y, 284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 285D, 285E,
285K, 285Q, 285W, 285Y, 286E, 286G, 286P, 286Y, 288D, 288E,
288Y, 290D, 290H, 290L, 290N, 290W, 291D, 291E, 291G, 291H,
291I, 291Q, 291T, 292D, 292E, 292T, 292Y, 293F, 293G, 293H,
293I, 293L, 293M, 293N, 293P, 293R, 293S, 293T, 293V, 293W,
293Y, 294F, 294G, 294H, 294I, 294K, 294L, 294M, 294P, 294R,
294S, 294T, 294V, 294W, 294Y, 295D, 295E, 295F, 295G, 295H,
295I, 295M, 295N, 295P, 295R, 295S, 295T, 295V, 295W, 295Y,
296A, 296D, 296E, 296G, 296H, 296I, 296K, 296L, 296M, 296N,
296Q, 296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F, 297G, 297H,
297I, 297K, 297L, 297M, 297P, 297Q, 297R, 297S, 297T, 297V,
297W, 297Y, 298A, 298D, 298E, 298F, 298H, 298I, 298K, 298M,
298N, 298Q, 298R, 298T, 298W, 298Y, 299A, 299D, 299E, 299F,
299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R,
299S, 299V, 299W, 299Y, 300A, 300D, 300E, 300G, 300H, 300K,
300M, 300N, 300P, 300Q, 300R, 300S, 300T, 300V, 300W, 301D,
301E, 301H, 301Y, 302I, 303D, 303E, 303Y, 304D, 304H, 304L,
304N, 304T, 305E, 305T, 305Y, 313F, 317E, 317Q, 318H, 318L,
318Q, 318R, 318Y, 320D, 320F, 320G, 320H, 320I, 320L, 320N,
320P, 320S, 320T, 320V, 320W, 320Y, 322D, 322F, 322G, 322H,
322I, 322P, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y, 323I, 324D, 324F,
324G, 324H, 324I, 324L, 324M, 324P, 324R, 324T, 324V, 324W,
324Y, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K, 325L,

325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325Y, 326E, 326I, 326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 327I, 327K, 327L, 327M, 327N, 327P, 327R, 327S, 327T, 327V, 327W, 327Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328I, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D, 329E, 329F, 329G, 329H, 329I, 329K, 329L, 329M, 329N, 329Q, 329R, 329S, 329T, 329V, 329W, 329Y, 330E, 330F, 330G, 330H, 330I, 330L, 330M, 330N, 330P, 330R, 330S, 330T, 330V, 330W, 330Y, 331D, 331F, 331H, 331I, 331L, 331M, 331Q, 331R, 331T, 331V, 331W, 331Y, 332A, 332D, 332E, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332N, 332P, 332Q, 332R, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 333A, 333F, 333H, 333I, 333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334A, 334F, 334I, 334L, 334P, 334T, 335D, 335F, 335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335N, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337E, 337H, e 337N, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

Em aspetos adicionais, a modificação aminoácido é 332E. A segunda modificação aminoácido pode ser selecionada a partir do grupo que consiste de: 236A, 239D, 332E, 268D, 268E, 330Y, e 330L. Em certos aspetos, a segunda modificação aminoácido é 239D.

Noutros aspetos, a modificação é uma modificação glicofoma que reduz o nível de fucose em relação ao anticorpo parente. Ainda noutros aspetos, a invenção é dirigida para uma composição incluindo pluralidade de anticorpos glicosilados como definido nas reivindicações, em que cerca de 80-100% dos anticorpos glicosilados na composição compreende uma estrutura de núcleo de hidrato de carbono madura que não possui fucose.

Numa forma de realização adicional, o anticorpo reduz a ligação a FcγRIIb em comparação com o anticorpo anti-CD19 parente.

A invenção é dirigida para um anticorpo que se liga a CD19 e compreende uma cadeia pesada variável com a SEQ ID NO:40 e uma cadeia leve variável com a SEQ ID NO:58. A cadeia pesada tem uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 132, uma CDR2 e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:116. A cadeia leve tem uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 120, uma CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NOS:129, e uma CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:130.

Um anticorpo aqui descrito pode ter uma sequência variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS: 13-16, 20-23, e 27-39 e 41-44, e/ou uma sequência variável de cadeia leve selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS: 17-19, 24-26, e 45-57 e 59-79.

Ainda noutras variações, o anticorpo inclui uma sequência de cadeia pesada selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS: 86 e 88 até 95, e/ou uma sequência de cadeia leve selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS: 96 até 105 e 107 até 110. O anticorpo da presente invenção compreende uma cadeia leve SEQ ID NO:106 e uma cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:87.

Em vários aspetos adicionais, a invenção é dirigida para uma sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo como definido nas reivindicações.

A presente invenção relaciona-se com um anticorpo como definido nas reivindicações ou uma composição como definida nas reivindicações para uso no tratamento de uma doença selecionada a partir do grupo que consiste de linfomas não

Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda das células B/linfoma (B-LLA), e linfoma de células do manto (LCM).

Em aspetos adicionais, a invenção é dirigida para uma composição compreendendo um anticorpo ou composição como definida nas reivindicações e um transportador aceitável.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos seguintes ilustram adicionalmente aspetos da invenção, e não são entendidos para limitar a invenção para qualquer aplicação particular ou teoria da operação.

Figura 1: Sequência de aminoácidos de CD 19 homo sapiens, como obtido a partir de cDNA clone MGC:12802, IMAGE:4054919, Número de acesso GenBank:BC006338.

Figura 2. Sequências de regiões constantes naturais de anticorpo, incluindo a cadeia leve de constante kappa de cadeia leve, e a cadeia pesada de constante gama para IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. É também fornecida a sequência de um cadeia constante IgG Híbrida, e uma cadeia constante IgG Híbrida compreendendo as substituições 239D e I332E.

Figura 3. Alinhamento das sequências de aminoácidos das imunoglobulinas IgG humanas IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.

A Figura 3a fornece as sequências dos domínios CH1 (C γ 1) e de articulação, e a Figura 3b fornece as sequências de domínios CH2 (C γ 2) e CH3 (C γ 3). As posições são numeradas de acordo com o índice EU da sequência de IgG1, e diferenças entre IgG1 e as outras imunoglobulinas IgG2, IgG3, e IgG4 são mostradas a cinzento. Existe polimorfismo alotípico num número de posições, e assim podem existir pequenas diferenças entre as sequências apresentadas e as

sequências da técnica anterior. Os inícios possíveis da região Fc são marcados, aqui definidos como posição EU 226 ou 230.

Figura 4. Os haplotipos comuns da cadeia gama da IgG1 humana (Figura 4a) e IgG2 (Figura 4b) mostram as posições e as substituições relevantes de aminoácidos.

Figura 5. Formas de realização preferidas dos perfis de ligação ao recetor que incluem aumentos de, reduções de, ou sem efeito na ligação a vários recetores, onde essas mudanças podem ser benéficas em certos contextos.

Figura 6. Sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve do 4G7 original e anticorpos HD37 (H0 e L0). A Figura 6a fornece as sequências dos domínios VH e VL, e a Figura 6b fornece as sequências das CDRs. Os limites de CDR são determinados de acordo com a convenção de Kabat (VH CDR1: 31-35b, VH CDR2: 50-65, VH CDR3: 95-102, VL CDR1: 24-34, VL CDR2: 50-56, e VL CDR3: 89-97).

Figura 7. Afinidades de ligação relativas de Híbrido 4G7 S239D/I332E e anticorpo 4G7 IgG 1 a um painel de recetores Fc.

Figura 8. CMCA de Híbrido 4G7 S239D/I332E, híbrido HD37 S239D/I332E, 4G7 IgG1, HD37 IgG1, e um anticorpo de controlo negativo na linha de células Daudi (Figura 8a) e CMCA de Híbrido 4G7 S239D/I332E, 4G7 IgG1, rituximab, e um anticorpo de controlo negativo nas linhas de células SUP-B15 e Raji (Figura 8b).

Figura 9. Um ensaio de ligação de superfície celular de Híbrido 4G7 S239D/I332E às células Raji.

Figura 10. A Figura 10a mostra ensaios CMCA de Híbrido 4G7 S239D/I332E, 4G7 IgG1, e rituximab num painel de 14 linhas de células representando vários linfomas e leucemias. Ambos os parâmetros de potência (EC50) e eficácia (% CMCA) são normalizados para o rituximab (anti-CD20). A Figura 10b lista os linfomas testados e as linhas de células de leucemia.

Figura 11. Sequências da região variável de cadeia pesada com reduzida imunogenicidade para anticorpo 4G7 anti-CD19.

Figura 12. Sequências da região variável de cadeia leve com reduzida imunogenicidade para anticorpo 4G7 anti-CD19.

Figura 13. Sequências da região variável de cadeia pesada reduzida imunogenicidade para anticorpo HD37 anti-CD19.

Figura 14. Sequências da região variável de cadeia leve de reduzida imunogenicidade para anticorpo HD37 anti-CD19.

Figura 15. Resultados de um ensaio de ligação de superfície celular de variantes 4G7 de imunogenicidade reduzida a células Raji (Figura 15a) e CMCA de HD37_H2L1 Híbrido S239D/I332E e 4G7_H1L3 Híbrido S239D/I332E em células MEC-1 (Figura 15b).

Figura 16. Afinidade de ligação celular em células RS4; 11 de afinidade amadurecida 4G7 em relação a H1L1 mAb.

Figura 17. Dados de afinidade de ligação celular a células RS4;11 de variantes 4G7 incubadas durante 5 dias a 37°C, pH 9,0 em 200 mM de Tris-LCP mostrando a estabilidade melhorada obtida.

Figura 18. Sequências para variantes de cadeia pesada de anti-CD19 que aumentam a afinidade e/ou a estabilidade.

Figura 19. Sequências para variantes de cadeia leve de anti-CD19 que aumentam a afinidade e/ou a estabilidade.

Figura 20. Propriedades antiproliferativas do Híbrido 4G7 S239D/I332E em células Raji.

Figura 21. Propriedades antiproliferativas do Híbrido S239D/I332E 4G7 de estabilidade e afinidade melhoradas em células SU-DHL-6 com e sem ligação cruzada.

Figura 22. Fagocitose de células Raji e RS4;11 com Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas de 4G7.

Figura 23. CMCA Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas de 4G7 contra linhas de células de linfoma múltiplo usando células assassinas naturais (NK) purificadas.

Figura 24. Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas 4G7 que se liga a células 293T transfetadas com CD19 humanas.

Figura 25. Reatividade cruzada de estabilidade de 4G7 e afinidade melhorada do Híbrido S239D/I332E para os CD19 de conimolgos e rhesus.

Figura 26. CMCA em células RS4;11 e MEC-1 usando um anticorpo anti-CD19 de função efetora melhorada (Híbrido S239D/I332E 4G7 H1L1) com baixo conteúdo em fucose proporcionada pela expressão no sistema Lec13.

Figura 27. Substituições únicas feitas para maior estabilidade e/ou afinidade. A numeração da região variável é de acordo com Kabat. Um conjunto expandido de posições está incluído nas CDRs. Os limites da CDR canónica definidos por Kabat, como listado na Figura 6, são realçados a cinza.

Figura 28. Variantes da região variável anti-CD19 construídas para otimizar a afinidade e estabilidade.

Figura 29. Variantes preferidas e aumento relativo na afinidade de ligação versus o parente H1L1 mAb.

Figura 30. Ensaio de proliferação das células B, mostrando a capacidade de variantes de anticorpos anti-CD19 para inibir a viabilidade de células B primárias. A Figura 30a mostra a dependência da dose do anticorpo anti-mu na proliferação de células B. A Figura 30b mostra a proliferação de células B na presença de anti-mu fixado (2 mg/mL) mais concentrações variadas de anticorpos controlo da variante WT e Fc de anti-CD19, e variante Fc anti-CD30. Anti-Anti-CD19_IgG1_WT = 4G7_H3_L1_IgG1_WT, Anti-CD19_Hybrid_S239D/I332E = 4G7_H3_L1_Hybrid_239D/332E, e Anti-CD30_S239D/I332E, aqui usado como um controlo negativo, = AC10_H3.69V2_L3.71_Híbrido_239D/332E (como divulgado na US 2007/0166309, Lazar G.A. et al., arquivado em 15 de Março, 2007).

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A divulgação é direccionada para anticorpos anti-CD19 modificados e métodos para uso dos mesmos. Em vários aspetos, os anticorpos podem ter um tendo uma região Fc modificada, sequências CDR específicas, sequências de região variável, e/ou modificações da região constante. Os

anticorpos podem ser humanizados. A presente invenção é além disso direcionada para anticorpos e composições como definido nas reivindicações para uso no tratamento de indicações de doença, como linfoma não-Hodgkin (LNH), leucemia linfoblástica aguda das células B (LLA) e outras doenças como definido nas reivindicações.

A fim de que a invenção possa ser mais completamente compreendida, várias definições são apresentadas abaixo. Essas definições são entendidas para incluir equivalentes gramaticais.

Por "CMCA" ou "citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo" como aqui usado entende-se a reação mediada por células em que células citotóxicas não específicas que expressam FcγRs reconhecem anticorpo ligado numa célula alvo e subsequentemente causa a lise das células alvo. Em vários aspetos, a função efetora CMCA aumentada pode significar potência melhorada e eficácia melhorada. Por "potência" como usado no contexto experimental entende-se a concentração do anticorpo quando é observado um efeito terapêutico particular EC50 (metade da concentração máxima eficaz). Por "eficácia" como usado no contexto experimental entende-se a função efetora máxima possível a níveis de saturação de anticorpo.

Por "FCDA" ou fagocitose mediada por células dependente de anticorpo como aqui usado é considerada a reação mediada por célula em que células citotóxicas não específicas que expressam FcγRs reconhecem o anticorpo ligado numa célula alvo e subsequentemente causa fagocitose da célula alvo.

Por "aminoácido" e "identidade de aminoácido" como aqui usado significa um dos 20 aminoácidos que correm naturalmente ou qualquer dos análogos não naturais que

devem estar presentes numa posição definida, específica. Assim "aminoácido" como aqui usado significa quer os aminoácidos que ocorrem naturalmente quer os sintéticos. Por exemplo, a homofenilalanina, citrulina e noreleucina são considerados aminoácidos para os fins da invenção. "Aminoácido" inclui também resíduos de iminoácidos tais como prolina e hidroxiprolina. A cadeia lateral pode ser tanto na configuração (R) como na (S). Na forma de realização preferida, os aminoácidos estão na configuração (S) ou L. Se são usadas cadeias laterais de ocorrência não natural, podem ser usados substituintes não aminoácido, por exemplo para evitar ou retardar a degradação *in vivo*.

Por "célula B" ou "linfócito B" como aqui usado significa um tipo de linfócitos desenvolvido na medula óssea que circula no sangue e linfa, e fornece imunidade humoral. As células B reconhecem moléculas sem antígeno e diferenciam-se ou maturam nas células plasmáticas que segregam imunoglobulina (anticorpos) que inativam os antígenos. São também geradas células de memória que fazem a imunoglobulina específica (anticorpo) em encontros posteriores com tal antígeno. As células B são também conhecidas como "células Beta" no ilhéu de Langerhans.

Por "célula B antígeno" ou "célula B marcadora" como aqui usado entende-se qualquer proteína que é expressa nas células B.

Por "CD19" como aqui usado entende-se a proteína da SEQ ID NO:1 (representada na Figura 1). CD19 é também conhecida como antígeno B4 da superfície das células B, antígeno CD19 das células B, antígeno CD19, e Leu-12. CD19 humana é designado GeneID:930 por Gene de Entrez, e HGNC:1633 por HGNC. A CD19 pode ser codificada pelo gene chamado CD19. O uso de "CD19" aqui pretende englobar todos os alelos

conhecidos ou ainda desconhecidos e formas polimorfas de CD19.

Por "CDC" ou "citotoxicidade dependente de complemento" como aqui usado entende-se a reação em que um ou mais componentes do complemento de proteína reconhece o anticorpo ligado numa célula alvo e subsequentemente causa a lise da célula alvo.

Por "região constante" como aqui usado entende-se o polipéptido que inclui pelo menos uma porção das primeiras três regiões constantes de um anticorpo, com pelo menos uma função efetora. Assim a região constante refere-se portanto aos três últimos domínios da região constante de imunoglobulina de IgA, IgD, e IgG, e os últimos quatro domínios de imunoglobulina das regiões constantes de IgE e IgM, e a articulação flexível N-terminal para estes domínios. Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, a região constante inclui os domínios de imunoglobulina C γ 1, C γ 2 e C γ 3 (C γ 1, C γ 2 e C γ 3) e a articulação entre C γ 1 (C γ 1) e C γ 2 (C γ 2). Embora os limites da região constante possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é usualmente definida para compreender resíduos do seu terminal carboxilo, em que a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat. A cadeia leve constante compreende tipicamente um único domínio, e como aqui definido refere-se às posições 108-214 de C κ ou C λ , em que a numeração é de acordo com o índice EU. Para anticorpos IgG de comprimento total, a cadeia pesada constante, como aqui definido, refere-se ao N terminal do domínio CH1 para o C terminal do domínio CH3, ou posições 118-447, em que a numeração é de acordo com o índice EU. "Região constante" pode referir-se a esta região isolada, ou um truncamento ou fusão incluem anticorpos, fusões Fc, Fcs isolados, e fragmentos Fc. Em várias formas

de realização, a região constante pode ser a região do anticorpo que é codificado por um dos genes da região constante das cadeias leves ou pesadas de imunoglobulina, i.e. a região de um anticorpo codificado pelas cadeias leves kappa ($C\kappa$) ou lambda ($C\lambda$). Em várias formas de realização, a cadeia pesada constante ou a região constante de cadeia pesada pode ser a região de um anticorpo codificado por genes mu, delta, gama, alfa, ou epsilon para definir o isotipo de anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, ou IgE, respetivamente.

Por "função efetora" como aqui usada entende-se um evento bioquímico que resulta da interação de uma região Fc de anticorpo com um recetor Fc ou ligando. As funções efetoras incluem funções efetoras mediadas por FcγR tais como CMCA e FCDA, e funções efetoras mediadas por complemento tais como CDC. Por "célula efetora" como aqui usado entende-se uma célula do sistema imunitário que expressa um ou mais recetores Fc e medeia uma ou mais funções efetoras. Células efetoras incluem mas não são limitados a monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos, plaquetas, células B, grandes linfócitos granulares, células de Langerhans, células assassinas (NK) naturais, e células T γδ, e podem ser de qualquer organismo incluindo mas não limitado a humanos, ratinhos, ratazanas, coelhos, e macacos.

Por "Fab" ou "região Fab" como aqui usado significa os polipéptidos que compreendem os domínios de imunoglobulina VH, CH1, VH, e CL. Fab pode referir-se a esta região isoladamente, ou a esta região no contexto de um anticorpo de comprimento total ou fragmento de anticorpo.

Por "Fc" ou "região Fc", como aqui usado entende-se o polipéptido compreendendo a região constante de um

anticorpo excluindo o primeiro domínio de imunoglobulina de região constante. Assim Fc refere-se aos últimos domínios de imunoglobulina de duas regiões constantes do IgA, IgD, e IgG, e os últimos três domínios de imunoglobulina da região constante de IgE e IgM, e a articulação flexível N-terminal a esses domínios. Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, Fc compreende os domínios de imunoglobulina Cgama2 e Cgama3 (C γ 2 e C γ 3) e a articulação entre Cgama1 (C γ 1) e Cgama2 (C γ 2). Embora os limites da região Fc possam variar, uma região Fc de cadeia pesada de IgG humana é usualmente definida para compreender os resíduos C226 ou P230 na sua terminação carboxilo, em que a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat. Fc pode referir-se a esta região isoladamente, ou a esta região no contexto de um polipéptido Fc, por exemplo um anticorpo. Por "polipéptido Fc" como aqui usado entende-se um polipéptido que compreende toda ou parte de uma região Fc. Os polipéptido Fcs incluem anticorpos, fusões Fc, Fcs isolados, e fragmentos de Fc.

Por "recetor Fc gama" ou "Fc γ R" como aqui usado entende-se qualquer membro da família das proteínas que ligam região Fc do anticorpo IgG. Em várias formas de realização, os Fc γ R são substancialmente codificados pelos genes Fc γ R. Em humanos esta família inclui mas não é limitada a Fc γ RI (CD64), incluindo as isoformas Fc γ RIa, Fc γ RIb, e Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), incluindo as isoformas Fc γ RIIa (incluindo os alotipos H131 e R131), Fc γ RIIb (incluindo Fc γ RIIb-1 e Fc γ RIIb-2), e Fc γ RIIc; e Fc γ RIII (CD16), incluindo as isoformas Fc γ RIIIa (incluindo os alotipos V158 e F158) e Fc γ RIIIb (incluindo os alotipos Fc- γ RIIIb-NA1 e Fc γ RIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65), assim como quaisquer isoformas Fc γ Rs ou Fc γ R ou alotipos humanos desconhecidos. Os Fc γ Rs de ratinho incluem mas não são limitados a Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD 16), e

FcγRIII-2 (CD16-2), assim como qualquer isoformas FcγRs ou FcγR ou alotipos de ratinho desconhecido. Um FcγR pode ser desde qualquer organismo, incluindo mas não limitado a humanos, ratinhos, ratazanas, coelhos, e macacos.

Por "ligando Fc" ou "recetor Fc" como aqui usado entende-se uma molécula, preferencialmente um polipéptido, a partir de qualquer organismo que se liga à região Fc de um anticorpo para formar um complexo Fc-ligando. Os ligandos Fc incluem mas não são limitados a FcγRs, FcRn, Clq, C3, lectina de ligação a manano, recetor de manose, proteína *estafilocócica A*, proteína *estreptocócica G*, e FcγR viral. Os ligandos Fc também incluem homólogos de recetor Fc (FcRH), que são uma família de recetores Fc que são homólogos para FcγRs (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136). Os ligandos Fc podem incluir moléculas não descobertas que ligam Fc.

Por "IgG" como aqui usado entende-se um polipéptido pertencente à classe dos anticorpos que são substancialmente codificados por um gene de gama imunoglobulina reconhecido. Em humanos esta classe compreende IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Em ratinhos esta classe compreende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Por "imunoglobulina (Ig)" aqui entende-se uma proteína consistindo de um ou mais polipéptidos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina. As imunoglobulinas incluem mas não são limitadas a anticorpos. As imunoglobulinas podem ter várias formas estruturais, incluindo mas não limitadas a anticorpos de comprimento total, fragmentos de anticorpo, e domínios de imunoglobulina individual. Por "domínio de imunoglobulina (Ig)" aqui entende-se uma região de uma imunoglobulina (Ig) que existe como uma entidade estrutural distinta como verificado, por um especialista na técnica de estrutura de

proteínas. Os domínios Ig tipicamente têm uma topologia de dobragem em sanduíche β característica. Os domínios Ig conhecidos na classe IgG de anticorpos são VH, Cy1, Cy2, Cy3, VL, e CL.

Por "modificação" aqui entende-se uma alteração nas propriedades físicas, químicas, ou sequência de uma proteína, polipéptido, anticorpo, ou imunoglobulina. Modificações preferidas da invenção são modificações de aminoácido e modificações de glicoforma.

Por "modificação de aminoácido" aqui entende-se uma substituição, inserção, e/ou deleção de aminoácido numa sequência de polipéptido. Por "substituição de aminoácido" ou "substituição" aqui entende-se a substituição de um aminoácido numa posição particular numa sequência de polipéptido parente por outro aminoácido. Por exemplo, a substituição I332E refere-se a um polipéptido variante, neste caso uma variante constante de cadeia pesada, na qual a isoleucina na posição 332 é substituída por ácido glutâmico. O resíduo WT pode ou não ser designada. No exemplo anterior, 332E indica a substituição da posição 332 com um ácido glutâmico. Para os fins presentes, múltiplas substituições são tipicamente separadas por uma barra. Por exemplo, 239D/332E refere-se a uma variante dupla compreendendo as substituições 239D e 332E. Por "inserção de aminoácido" ou "inserção" como aqui usado entende-se a adição de um aminoácido na posição particular numa sequência de polipéptido parente. Por exemplo, inserir -236 designa uma inserção de glicina na posição 236. Por "deleção de aminoácido" ou "deleção" como aqui usado entende-se a remoção de um aminoácido na posição particular numa sequência de polipéptidos parente. Por exemplo, G236- designa a deleção da glicina na posição 236.

Por "modificação de glicoforma" ou "glicoforma modificada" ou "glicoforma modificada geneticamente" como aqui usado entende-se uma composição hidrato de carbono que está ligada covalentemente a uma proteína, por exemplo um anticorpo, em que a referida composição hidrato de carbono difere quimicamente da de uma proteína parente. Glicoforma modificada tipicamente refere-se a diferentes hidrato de carbono ou oligossacáridos; assim por exemplo um anticorpo pode compreender uma glicoforma modificada. Em alternativa, a glicoforma modificada pode referir-se ao anticorpo que compreende o hidrato de carbono ou oligossacárido diferente.

Por "polipéptido parente", "proteína parente", "polipéptido precursor", ou "proteína precursora" como aqui usados entende-se um polipéptido não modificado que é subsequentemente modificado para gerar uma variante. O referido polipéptido parente pode ser um polipéptido que ocorre naturalmente, ou uma variante ou versão geneticamente modificada de um polipéptido que ocorre naturalmente. Polipéptido parente pode referir-se ao próprio polipéptido, as composições que compreendem o polipéptido parente, ou a sequência de aminoácidos que o codifica. Consequentemente, por "anticorpo parente" ou "imunoglobulina parente" como aqui usado entende-se um anticorpo ou imunoglobulina que é modificada para gerar uma variante. Por "anticorpo anti-CD19 parente" ou "imunoglobulina anti-CD19 parente" como aqui usado entende-se um anticorpo ou imunoglobulina que liga CD19 e é modificada para gerar uma variante.

Por "proteína" ou "polipéptido" como aqui usado entende-se pelo menos dois aminoácidos ligados covalentemente, que incluem proteínas, polipéptidos, oligopéptidos e péptidos. A proteína pode ser efetuada de aminoácidos que ocorrem

naturalmente e ligações peptídicas, ou estruturas peptidomiméticas sintéticas, i.e. "análogos", tais como peptóides.

Por "posição" como aqui usado entende-se a localização na sequência de uma proteína. As posições podem ser numeradas sequencialmente, ou de acordo com um formato estabelecido, por exemplo o índice EU como em Kabat. Posições correspondentes são determinadas como aqui realçado, geralmente através de alinhamento com outras sequências parentes.

Por "resíduo" como aqui usado entende-se a posição numa proteína e a sua identidade de aminoácido associada. Por exemplo, a Asparagina 297 (também referida como Asn297 e N297) é um resíduo na posição 297 no anticorpo IgG1 humano.

Por "antigénio alvo" ou "alvo" ou "antigénio" como aqui usado entende-se a molécula que está ligada especificamente pela região variável de um dado anticorpo. Um antigénio alvo pode ser uma proteína, hidrato de carbono, lípido, ou outro composto químico. Por "célula alvo" como aqui usado entende-se uma célula que expressa um antigénio alvo.

Por "região variável" entende-se a região variável de uma cadeia pesada ou da cadeia leve de anticorpo. A região variável de cadeia pesada (VH), como aqui definido, refere-se a terminação N à terminação C do domínio VH, definida pelos resíduos 1-113 de acordo com a convenção de numeração de Kabat. A região variável de cadeia leve (VL), como aqui definido, refere-se à terminação N terminal da terminação C do domínio VL, definida pelos resíduos 1-107 de acordo com a convenção de numeração de Kabat. Os especialistas na técnica reconhecerão que a convenção da numeração da região variável de Kabat emprega letras para contar o comprimento

variável de CDRs. Assim uma VH é definida pelos resíduos 1-113 de Kabat, e que uma VL é definida por 1-107 de Kabat, não significa necessariamente que o domínio VH contenha exatamente 113 resíduos, nem que VL contenha exatamente 107 resíduos. Em vez disso, os resíduos 1-113 de VH e 1-107 de VL de acordo com Kabat destinam-se a englobar os domínios estruturais que foram determinados pelos alinhamentos da sequência de um largo conjunto de regiões variáveis de anticorpo de comprimento variável (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). Em certas formas de realização, a região variável pode compreender um ou mais domínios Ig codificados substancialmente por qualquer dos genes V_{κ} , V_{λ} , e/ou V_H que constituem os locais genéticos de imunoglobulina kapa, lambda, e de cadeia pesada, respetivamente.

Por "proteína variante", "variante de proteína", "polipéptido variante", ou "variante de polipéptido" como aqui usado entende-se uma sequência de polipéptido que difere da de uma sequência do polipéptido parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido. Polipéptido variante pode referir-se ao próprio polipéptido, uma composição compreendendo o polipéptido, ou a sequência amino que o codifica. Preferencialmente, o polipéptido variante tem pelo menos uma modificação de aminoácido em comparação com o polipéptido parente, por exemplo desde cerca de uma até cerca de dez modificações de aminoácido, e preferencialmente desde cerca de uma até cerca de cinco modificações de aminoácido em comparação com o parente. A sequência de polipéptido variante aqui preferencialmente possuirá pelo menos cerca de 80% de homologia com uma sequência de polipéptido parente, e o mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% de homologia,

mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% de homologia. Consequentemente, por "anticorpo variante" ou "variante de anticorpo" como aqui usado entende-se uma sequência de anticorpo que difere da sequência de anticorpo parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido. Variante de anticorpo pode referir-se ao próprio anticorpo polipéptido, composições compreendendo o anticorpo polipéptido variante, ou a sequência de aminoácidos que a codifica. Consequentemente, por "variante de anticorpo" ou "variante de anticorpo" como aqui usado entende-se um anticorpo, conforme definido acima, que difere na sequência da sequência do anticorpo parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido. Anticorpo variante pode referir-se à própria proteína, as composições compreendendo a proteína, ou a sequência de aminoácidos que a codifica. Consequentemente, por "variante constante de cadeia pesada" ou "variante constante de cadeia leve" ou "Variante Fc" como aqui usado entende-se a constante de cadeia pesada, constante cadeia leve, ou polipéptido ou sequência da região Fc, respetivamente, que difere na sequência da de uma sequência parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido.

Por "tipo selvagem ou WT" aqui entende-se uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleótidos que é encontrada na natureza, incluindo as variações alélicas. A proteína WT, polipéptido, anticorpo, imunoglobulina, IgG, etc., têm uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleótidos que não foi intencionalmente modificada.

Para todas as posições da região constante da cadeia pesada de imunoglobulina discutidas na presente invenção, a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed., United States Public Health Service,

National Institutes of Health, Bethesda). O "índice EU como em Kabat" refere-se à numeração de resíduo do anticorpo IgG1 EU humano, como descrito em Edelman et al., 1969, Biochemistry 63:78-85.

Anticorpos

Como aqui usado, o termo "anticorpo" refere-se a uma proteína monomérica ou multimérica compreendendo uma ou mais cadeias de polipéptidos. Um anticorpo liga-se especificamente a um antígeno (por exemplo CD 19) e pode ser capaz de modular a atividade biológica do antígeno. Como aqui usado, o termo "anticorpo" pode incluir "anticorpo de comprimento total" e "polipéptido Fc."

Por "anticorpo de comprimento total" aqui entende-se a estrutura que constitui a forma biológica natural de um anticorpo, incluindo as regiões variável e constante. Por exemplo, na maioria dos mamíferos, incluindo humanos e ratinhos, o anticorpo de comprimento total da classe IgG é um tetrâmero e consiste de dois pares idênticos de duas cadeias de imunoglobulina, cada par com uma cadeia leve e uma pesada, cada cadeia leve compreendendo domínios de imunoglobulina VL e CL, e cada cadeia pesada compreendendo os domínios de imunoglobulina VH, CH1 (C γ 1), CH2 (C γ 2), e CH3 (C γ 3). Em alguns mamíferos, por exemplo em camelos e lamas, os anticorpos IgG podem consistir somente de duas cadeias pesadas, cada cadeia pesada compreendendo um domínio variável ligado à região Fc.

O termo "anticorpo" inclui também fragmentos de anticorpo. Os fragmentos específicos de anticorpo incluem, mas não são limitados a, (i) o fragmento Fab que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1, (ii) o fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1, (iii) o fragmento Fv que consiste nos

domínios VL e VH de um único anticorpo; (iv) o fragmento dAb (Ward et al., 1989, *Nature* 341:544-546) o qual consiste de uma única variável, (v) regiões CDR isoladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados (vii) moléculas Fv de cadeia simples (scFv), em que um domínio VH e um domínio VL são ligados por um ligante peptídico o qual permite que os dois domínios se associem para formar um sítio de ligação a antígeno (Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426, Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883), (viii) dímeros Fv de cadeia única biespecífica (PCT WO 1993/011161) e (ix) "diacorpos" ou "triacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão de genes (Tomlinson et. al., 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448). Em certas formas de realização, os anticorpos são produzidos por técnicas de DNA recombinante. Outros exemplos de formatos e arquiteturas de anticorpo são descritos em Holliger & Hudson, 2006, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136, e Carter 2006, *Nature Reviews Immunology* 6:343-357 e referências aqui citadas. Em formas de realização adicionais, os anticorpos são produzidos por clivagem enzimática ou química dos anticorpos que ocorrem naturalmente.

Unidades estruturais de anticorpo natural tipicamente compreendem um tetrâmero. Cada tetrâmero é tipicamente composto por dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par com uma cadeia "leve" (tipicamente com um peso molecular de cerca de 25 kDa) e uma "pesada" (tipicamente com um peso molecular de cerca de 50-70 kDa). Cada uma das cadeias leves e pesadas são constituídas por duas regiões distintas, referidas como regiões variável e constante. Para a classe IgG de imunoglobulinas, a cadeia pesada é composta por quatro domínios de imunoglobulina

ligados da terminação N- à C- pela ordem VH-CH1-CH2-CH3, em relação ao domínio variável de cadeia pesada, domínio constante 1 de cadeia pesada, domínio constante 2 de cadeia pesada, e domínio constante 3 de cadeia pesada respectivamente (também referido como VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3, em relação ao domínio variável de cadeia pesada, domínio constante gama 1, domínio constante gama 2, e domínio constante gama 3 respectivamente). A Cadeia leve de IgG é composta por dois domínios de imunoglobulina ligados da terminação N- para a C pela ordem V_L-C_L, em relação ao domínio variável de cadeia leve e o domínio constante de cadeia leve respectivamente. As regiões constantes mostram menor diversidade de sequência, e são responsáveis pela ligação de algumas das proteínas naturais para eliciar eventos bioquímicos importantes.

A região variável de um anticorpo contém os determinantes de ligação a antígeno de uma molécula, e assim determina a especificidade de um anticorpo para o seu antígeno alvo. A região variável é assim chamada porque é a mais distinta na sequência dos outros anticorpos dentro da mesma classe. Na região variável, estão reunidas três ansas para cada um dos domínios V de cadeia pesada e cadeia leve para formar um sítio de ligação a antígeno. Cada uma das ansas é referida como uma região de determinação de complementaridade (de aqui em diante referida como uma "CDR"), na qual a variação na sequência de aminoácidos é a mais significativa. Há um total de 6 CDRs, três para cada cadeia pesada e leve, designadas V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR3, V_L CDR1, V_L CDR2, e V_L CDR3. A região variável fora das CDRs é referida como a região estrutural (FR). Embora não seja tão diversa como as CDRs, a variabilidade de sequência ocorre na região FR entre diferentes anticorpos. Acima de tudo, esta arquitetura característica dos anticorpos fornece uma base estável (a região FR) na qual substancial diversidade de

ligação a antígeno (as CDRs) pode ser explorada pelo sistema imunitário para obter especificidade para uma ampla gama de antígenos. Um certo número de estruturas de alta resolução estão disponíveis para uma diversidade de fragmentos de região variável de diferentes organismos, alguns não ligados e alguns complexados com o antígeno. As características estruturais e de sequência das regiões variáveis de anticorpo são divulgadas, por exemplo, em Morea et al., 1997, *Biophys Chem* 68:9-16; Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-279, e as características conservadas dos anticorpos são divulgadas, por exemplo, em Maynard et al., 2000, *Annu Ver Biomed Eng* 2:339-376.

Os anticorpos são agrupados em classes, também referidas como isotipos, como determinado geneticamente pela região constante. As cadeias leves constantes humanas são classificadas como cadeias leves kappa (κ) e lambda (λ). As cadeias pesadas são classificadas como mu, delta, gama, alfa, ou epsilon, e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. A classe IgG é a mais comumente usada para fins terapêuticos. Em humanos esta classe compreende as subclasses IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Em ratinhos esta classe compreende as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. A IgM tem subclasses, incluindo, mas não limitadas a, IgM1 e IgM2. A IgA tem várias subclasses, incluindo mas não limitada a IgA1 e IgA2. Assim, "isotipo" como aqui usado significa qualquer das classes ou subclasses de imunoglobulinas definidas pelas características químicas e antigênicas das suas regiões constantes. Os isotipos de imunoglobulina humana conhecidos são IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE. A Figura 2 fornece as sequências da cadeia leve humana kappa e das cadeias constantes de cadeia pesada gama. A Figura 3 mostra um alinhamento de cadeias pesadas constantes da IgG humana.

Podem também ser úteis as IgGs que são composições híbridas de isotipos de IgG naturais humanos. Funções efetoras tais como CMCA, FCDA, CDC, e meia vida sérica diferem significativamente entre as diferentes classes de anticorpos, incluindo por exemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, e IgM humanas (Michaelson et al., 1992, *Molecular Immunology*, 29(3): 319-326). Uma série de estudos têm explorado as variantes IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 a fim de investigar os determinantes das diferenças da função efetora entre elas. Ver por exemplo Canfield & Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173: 1483-1491; Chappel et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(20): 9036-9040; Chappel et al., 1993, *Journal of Biological Chemistry* 268:25124-25131; Tao et al., 1991, *J. Exp. Med.* 173: 1025-1028; Tao et al., 1993, *J. Exp. Med.* 178: 661-667; Redpath et al., 1998, *Human Immunology*, 59, 720-727.

Como descrito na US 2006/0134105, registada em outubro 21, 2005, intitulada "IgG Immunoglobulin Variants with Optimized Effector Function", é possível manipular modificações de aminoácido num anticorpo que compreende as regiões constantes de outras classes de imunoglobulina, por exemplo como as ilustradas nos alinhamentos na Figura 3. Essas composições de IgG híbridas manipuladas podem fornecer propriedades de função efetora melhoradas, incluindo CMCA, fagocitose, CDC, e meia vida sérica melhorados. Por exemplo, como ilustrado pela Figura 3, uma variante híbrida IgG1/IgG3 pode ser construída por substituição das posições IgG1 nas regiões CH2 e CH3 com os aminoácidos da IgG3 em posições onde os dois isotipos diferem. Portanto um anticorpo variante híbrido IgG pode ser construído para compreender uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo que consiste em: 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R, e

436F, em que a numeração é de acordo com o índice EU. Essas variantes podem fornecer propriedades de função efetora alternativas e/ou melhoradas.

Como outro exemplo, a função efetora relativamente pobre da IgG2 pode ser melhorada substituindo os resíduos chave de ligação a FcγR com os correspondentes aminoácidos numa IgG com melhor função efetora. Por exemplo, as diferenças entre os resíduos chave entre IgG2 e IgG1 em relação a ligação FcγR podem incluir P233, V234, A235, -236 (referente à deleção em IgG2 em relação a IgG1), e G327. Portanto uma ou mais modificações de aminoácido na IgG2 parente em que um ou mais desses resíduos é substituído com os correspondentes aminoácidos IgG1, P233E, V234L, A235L, -236G (referente a uma inserção de uma glicina na posição 236), e G327A, pode fornecer função efetora aumentada. A sequência de uma tal IgG, compreendendo um híbrido de resíduos de IgG1 e IgG2, aqui referida como "Híbrida" nos Exemplos e Figuras, é fornecida na Figura 2.

Tal como é conhecido na técnica, o polimorfismo da imunoglobulina existe na população humana. O polimorfismo da Gm é determinado pelos genes IGHG1, IGHG2 e IGHG3 os quais têm alelos que codificam determinantes antigénicos alotípicos referido como alotipos G1m, G2m, e G3m para marcadores das moléculas IgG1, IgG2 e IgG3 humano (nenhuns alotipos Gm foram encontrados na cadeia 4 gama). Os marcadores podem ser classificados em 'alotipos' e 'isoalotipos'. Estes são identificados em diferentes bases sorológicas dependentes de uma forte homologia de sequências entre isotipos. Os alotipos são determinantes antigénicos especificados por formas alélicas dos genes Ig. Os alotipos representam pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos das cadeias pesada e leve de diferentes indivíduos. Mesmo uma única diferença de aminoácido pode

dar origem a um determinante alelotípico, embora em muitos casos sejam várias as substituições de aminoácidos que ocorrem. Os alotipos são diferenças de sequência entre alelos de uma subclasse pelo que os anti-soros reconhecem apenas as diferenças alélicas. Um isoalotipo é um alelo num isotipo que produz um epitopo que é partilhado com uma região homóloga não polimórfica de um ou mais de outros isotipos e devido a isto o antisoro irá reagir com alotipos relevantes e com os isotipos homólogos relevantes (Clark, 1997, IgG effector mechanisms, Chem Immunol. 65:88-110; Gorman & Clark, 1990, Semin Immunol 2(6):457-66).

As formas alélicas de imunoglobulinas humanas foram bem caracterizadas (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. J Immunogen 1976, 3: 357-362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. 1976, Eur. J. Immunol. 6, 599-601; E. van Loghem, 1986, Allotypic markers, Monogr Allergy 19: 40-51). Adicionalmente, outros polimorfismos foram caracterizados (Kim et al., 2001, J. Mol. Evol. 54:1-9). Atualmente, são conhecidos 18 alotipos Gm: G1m (1, 2, 3, 17) ou G1m (a, x, f, z), G2m (23) ou G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) ou G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Os alotipos que são herdados em combinações fixadas são chamados haplotipos Gm. A Figura 4 mostra haplotipos comuns da cadeia gama de IgG1 humano (Figura 4a) e IgG2 (Figura 4b) mostrando as posições e as substituições de aminoácidos relevantes. As sequências de aminoácidos destas versões alotípicas de IgG 1 e IgG2 são fornecidas como SEQ IDs: 80-85. Os anticorpos da presente invenção podem ser substancialmente codificados

por qualquer alotipo, isoalotipo, ou haplotipo de qualquer gene de imunoglobulina.

Formas alélicas de imunoglobulinas humanas foram bem caracterizadas (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. *J Immunogen* 1976, 3: 357-362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of imunoglobulinas humanas. 1976, *Eur. J. Immunol.* 6, 599-601; E. van Loghem, 1986, Allotypic markers, *Monogr Allergy* 19: 40-51). Adicionalmente, outros polimorfismos foram caracterizados (Kim et al., 2001, *J. Mol. Evol.* 54:1-9). Presentemente, são conhecidos 18 alotipos Gm: G1m (1,2, 3, 17) ou G1m (a, x, f, z), G2m (23) ou G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) ou G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation*. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, *Hum. Genet.*: 50, 199-211). Alotipos que são herdados em combinações fixas são chamados haplotipos Gm. A Figura 4 mostra haplotipos comuns da cadeia gama de IgG1 humana (Figura 4a) e IgG2 (Figura 4b) mostrando as posições e as substituições de aminoácidos relevantes. Os anticorpos da presente invenção podem ser substancialmente codificados por qualquer teletipo, isoalotipo, ou haplotipo de qualquer gene de imoglobulina. Os anticorpos da presente invenção podem ser substancialmente codificados por genes de qualquer organismo, preferencialmente mamíferos, incluindo mas não limitado a humanos, roedores incluindo mas não limitado a ratinhos e ratos, lagomorfos incluindo mas não limitado a coelhos e lebres, camelídeos incluindo mas não limitado a camelos, lamas, e dromedários, e primatas não humanos, incluindo mas não limitado a Prossímios, Platyrrhini (macacos do Novo Mundo), Cercopithecoidea (macacos do Velho Mundo), e Hominoidea incluindo os Gibões

e Macacos Menores e Grandes. Numa forma de realização mais preferida, os anticorpos da presente invenção são substancialmente humanos. Os anticorpos da presente invenção podem ser substancialmente codificados por genes de imunoglobulina pertencentes a qualquer das classes de anticorpo. Numa forma de realização mais preferida, os anticorpos da presente invenção compreendem sequências pertencentes à classe de anticorpos IgG, incluindo subclasses de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 humanas. Numa forma de realização alternativa, os anticorpos da presente invenção compreendem sequências pertencentes às classes de anticorpos IgA (incluindo subclasses IgA1 e IgA2 humanas), IgD, IgE, IgG, ou IgM. Os anticorpos da presente invenção podem compreender mais do que uma cadeia de proteína. Ou seja, a presente invenção pode encontrar uso num anticorpo que é um monómero ou um oligómero, incluindo um homo- ou hetero-oligómero.

Na forma de realização mais preferida, os anticorpos da invenção baseiam-se em sequências de IgG humanas, e assim as sequências de IgG humanas são usadas como sequências "base" em relação às quais outras sequências são comparadas, incluindo mas não limitado a sequências de outros organismos, por exemplo sequências de roedores e primatas, assim como sequências de outras classes de imunoglobulina tais como IgA, IgE, IgGD, IgGM, e as afins. É também contemplado que, embora os anticorpos da presente invenção sejam manipulados no contexto de um anticorpo parente, as variantes podem ser manipulados em ou "transferidos" para o contexto de outro, segundo anticorpo parente. Isto é realizado determinando os resíduos e substituições "equivalentes" ou "correspondentes" entre o primeiro e segundo anticorpo, tipicamente com base na homologia de sequência ou estrutural entre as sequências dos dois anticorpos. Com vista a estabelecer a homologia, a

sequência de aminoácidos de um primeiro anticorpo aqui evidenciado é diretamente comparado com a sequência de um segundo anticorpo. Após o alinhamento das sequências, usando um ou mais dos programas de alinhamento de homologia conhecidos na técnica (por exemplo usando resíduos conservados como entre espécies), permitindo as necessárias inserções e deleções com vista a manter o alinhamento (i.e., evitando a eliminação de resíduos conservados através de deleção e inserção arbitrária), são definidos os resíduos equivalentes de aminoácidos específicos na sequência primária do primeiro anticorpo. O alinhamento de resíduos conservados preferencialmente deve conservar 100% desses resíduos. No entanto, um alinhamento superior a 75% ou tão baixo como 50% dos resíduos conservados é também adequado para definir os resíduos equivalentes. Os resíduos equivalentes podem também ser definidos determinando a homologia estrutural entre um primeiro e um segundo anticorpo ou seja ao nível da estrutura terciária para anticorpos cujas estruturas foram determinadas. Neste caso, os resíduos equivalentes são definidos como aqueles para os quais as coordenadas atômicas de dois ou mais dos principais átomos da cadeia de um resíduo de aminoácido particular do parente ou precursor (N em N, CA em CA, C em C e O em O) estão dentro de 0,13 nm e preferencialmente 0,1 nm após alinhamento. O alinhamento é atingido após o melhor modelo ter sido orientado e posicionado para dar a sobreposição máxima de coordenadas atômicas de átomos de proteína não hidrogénio das proteínas. Independentemente de como os resíduos equivalentes ou correspondentes são determinados, e independentemente da identidade do anticorpo parente em que os anticorpos são feitos, o que se pretende transmitir é que os anticorpos divulgados pela presente invenção podem ser manipulados em qualquer segundo anticorpo parente que tenha homologia de sequência ou estrutural significativa com o referido anticorpo. Portanto

por exemplo, se é gerado um anticorpo variante em que o anticorpo parente é IgG1 humano, usando os métodos descritos acima ou outros métodos para determinar os resíduos equivalentes, o referido anticorpo variante pode ser manipulado num anticorpo progenitor de IgG2 humano, num anticorpo parente IgA humano, num anticorpo parente IgG2a ou IgG2b de rato, e afins. Novamente, como descrito acima, o contexto do anticorpo parente não afeta a capacidade para transferir os anticorpos da presente invenção para outros anticorpos parentes. Por exemplo, as variantes de anticorpo que são manipuladas num anticorpo IgG1 humano que tem como alvo um epítipo do antígeno pode ser transferido para um anticorpo IgG2 humano que visa um epítipo do antígeno diferente, e assim por diante.

Na classe IgG das imunoglobulinas, existem vários domínios de imunoglobulinas na cadeia pesada. Por "domínio de imunoglobulina (Ig)" é aqui pretendida uma região de uma imunoglobulina (Ig) com uma estrutura terciária distinta. Com interesse para a presente invenção são os domínios de cadeia pesada constante, (incluindo, uns domínios de cadeia pesada constante (CH) e a articulação. No contexto dos anticorpos IgG, cada um dos isotipos IgG tem três regiões CH: "CH1" refere-se às posições 118-220, "CH2" refere-se às posições 237-340, e "CH3" refere-se às posições 341-447 de acordo com o índice EU como em Kabat. Por "articulação" ou "região de articulação" ou "região de articulação de anticorpo." ou "região de articulação de imunoglobulina" aqui entende-se o polipéptido flexível compreendendo os aminoácidos entre os primeiro e o segundo domínios constantes de um anticorpo. Estruturalmente, a extremidade do domínio IgG CH1 na posição 220 de EU, e o domínio IgG CH2 começa na posição 237 de EU do resíduo. Assim, para a IgG a articulação é aqui definida para incluir as posições 221 (D221 em IgG1) até 236 (G236 em IgG1), em que a numeração é de acordo com

o índice EU como em Kabat. Em algumas formas de realização, por exemplo no contexto de uma região Fc, a articulação mais baixa está incluída, com a "articulação inferior" geralmente referente às posições 226 ou 230. A cadeia pesada constante, como aqui definida, refere-se ao N terminal do domínio CH1 ao C terminal do domínio CH3, compreendendo, assim, as posições 118-447, em que a numeração é de acordo com o índice EU. A cadeia leve constante compreende um único domínio, e como aqui definido refere-se às posições 108-214 de C κ ou C λ , em que a numeração é de acordo com o índice EU.

Os anticorpos da invenção podem incluir anticorpos multiespecíficos, notavelmente anticorpos biespecíficos, também por vezes referidos como "diacorpos". Estes são anticorpos que se ligam a dois (ou mais) antigénios diferentes. Os diacorpos podem ser fabricados por uma diversidade de modos conhecidos na técnica, por exemplo, preparados quimicamente ou a partir de hibridomas híbridos. Numa forma de realização, o anticorpo é um minicorpo. Os minicorpos são proteínas do tipo anticorpo minimizado compreendendo um scFv ligado a um domínio CH3. Em alguns casos, o scFv pode estar ligado à região Fc, e pode incluir algum ou todos os da região de articulação. Para uma descrição de anticorpos multiespecíficos ver Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 e referências aqui citadas.

O anticorpo aqui descrito pode ser um fragmento de anticorpo. De especial interesse são os anticorpos que compreendem regiões Fc, fusões Fc, e a região constante da cadeia pesada (CH1-articulação-CH2-CH3). Os referidos anticorpos podem compreender fragmentos Fc. Um fragmento Fc da presente invenção pode compreender desde 1 - 90% da região Fc, com 10 - 90% sendo preferido, e 30 - 90% sendo o

mais preferido. Assim, por exemplo, um fragmento Fc pode compreender um domínio IgG1 C γ 2, um domínio IgG1 C γ 2 e a região de articulação, um domínio IgG1 C γ 3, e assim por diante. Numa forma de realização, um fragmento Fc adicionalmente compreende um parceiro de fusão, tornando-o efetivamente uma fusão de fragmento Fc. Os fragmentos Fc podem ou não conter uma sequência de polipéptido extra.

- Anticorpos quiméricos, humanizados, e completamente humanos

A imunogenicidade é o resultado de uma série de respostas complexas a uma substância que é reconhecida como estranha, e pode incluir a produção de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes, a formação de complexos imunológicos, a ativação de complemento, ativação de mastócitos, inflamação, respostas de hipersensibilidade, e anafilaxia. Vários fatores podem contribuir para a imunogenicidade da proteína, incluindo mas não limitado a sequência de proteína, via e frequência de administração, e população doente. A imunogenicidade pode limitar a eficácia e a segurança da proteína terapêutica de múltiplos modos. A eficácia pode ser reduzida diretamente pela formação de anticorpos neutralizantes. A eficácia pode ser também reduzida indiretamente, por ligação ou a anticorpos neutralizantes ou a não neutralizantes tipicamente conduz a eliminação rápida do soro. Podem ocorrer efeitos secundários graves e mesmo morte quando aparece uma reação imunológica. Assim, a manipulação de proteínas pode ser usada para reduzir a imunogenicidade dos anticorpos da presente invenção.

Em algumas formas de realização, os componentes da estrutura podem ser uma mistura de espécies diferentes. Esse anticorpo pode um anticorpo quimérico e/ou um

anticorpo humanizado. Em geral, tanto os "anticorpos quiméricos" como os "anticorpos humanizados" referem-se a anticorpos que combinam regiões de mais de uma espécie. Os "Anticorpos quiméricos" tradicionalmente compreendem região(ões) variável(eis) de um ratinho (ou rato, em alguns casos) e a(s) região(ões) constante(s) de um humano (Morrison et al., 1984, Proc Natl Acad Sci USA 81: 6851-6855).

Por anticorpo "humanizado" como aqui usado entende-se um anticorpo compreendendo uma região estrutural humana (FR) e uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDR's) de um anticorpo não humano (usualmente ratinho ou rato). O anticorpo não humano EP fornecendo as CDR's é chamado o "dador" e a imunoglobulina humana que fornece a estrutura é chamada o "aceitador". Em certas formas de realização, a humanização assenta principalmente sobre a inserção de enxertos de CDRs dadoras nas estruturas VL e VH do aceitador (humano) (Winter US 5225539). Esta estratégia é referida como "enxerto de CDR". A "Retromutação" dos resíduos da estrutura do aceitador selecionado nos correspondentes resíduos dadores é muitas vezes necessária para recuperar a afinidade que é perdida na construção do enxerto inicial (US 5693762). O anticorpo humanizado otimamente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Ig), tipicamente a da imunoglobulina humana, e portanto, tipicamente, irá compreender uma região Fc humana. Uma multiplicidade de técnicas e métodos para humanizar e reformular anticorpos não humanos são bem conhecidos na técnica (Ver Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), e as referências aqui citadas). A humanização ou outros métodos de redução da imunogenicidade de regiões variáveis de anticorpo não humano pode incluir métodos de

recapeamento, como descrito por exemplo em Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973. Os métodos baseados na seleção podem ser empregues em regiões variáveis de anticorpo humanizado e/ou de afinidade madura, quer dizer, para aumentar a afinidade da região variável para o seu antigénio alvo. Outros métodos de humanização podem envolver o enxerto somente de partes das CDRs, incluindo mas não limitado a métodos descritos na US 2002/0034765; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169: 3076-3084. Podem ser empregues métodos com base na estrutura para maturação da humanização-e afinidade, por exemplo como descrito na US 2002/0177170 e pedidos relacionados.

Em certas variações, a imunogenicidade do anticorpo é reduzida usando um método descrito na US 2006/0008883, intitulada "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof", registada em 3 de dezembro, 2004.

As modificações para reduzir a imunogenicidade podem incluir modificações que reduzem a ligação do péptido processado derivado da sequência parente às proteínas MHC. Por exemplo, as modificações de aminoácido devem ser manipuladas de modo a que não sejam ou que só um número mínimo dos epítomos imunológicos seja previsto ligar-se, com alta afinidade, a quaisquer alelos MHC prevalentes. Vários métodos de identificação de epítomos ligados a MHC nas sequências de proteína são conhecidos na técnica e podem ser usados para medir os epítomos num anticorpo da presente invenção. Ver por exemplo US 2002/0119492, US 2004/0230380, US 2006/0148009, e referências aí citadas.

Numa forma de realização alternativa, os anticorpos da presente invenção podem ser totalmente humanos, ou seja as

sequências dos anticorpos são completamente ou substancialmente humanas. "Anticorpo totalmente humano" ou "anticorpo completamente humano" refere-se a um anticorpo humano com a sequência de gene de um anticorpo derivado de um cromossoma humano com as modificações aqui sublinhadas. São conhecidos na técnica vários métodos para gerar anticorpos totalmente humanos, incluindo o uso de ratinhos transgênicos (Bruggemann et al., 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455-458,) ou bibliotecas de anticorpos humanos ligadas a métodos de seleção (Griffiths et al., 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108).

Anticorpos que visam CD19

Os anticorpos da presente invenção como definido nas reivindicações ligam-se a CD19. As regiões variáveis de quaisquer anticorpos anti-CD19 conhecidos ou desconhecidos podem encontrar utilização. Os anticorpos aqui divulgados podem apresentar seletividade para CD 19 versus alvos alternativos, ou seletividade para uma forma específica do alvo versus formas alternativas. Exemplos incluem comprimento total versus variantes de emenda, formas superfície celular versus formas solúveis, seletividade para várias variantes polimórficas, ou seletividade para formas conformacionais específicas de um alvo. Um anticorpo aqui divulgado pode ligar qualquer epitopo ou região no CD19, e pode ser específico para fragmentos, formas mutantes, formas de emenda, ou formas aberrantes dos referidos antígenos. Foi encontrado um certo número de anticorpos úteis que visam CD19 que podem encontrar aplicação. Anticorpos ou imunoadesinas adequados incluem os anticorpos CD19 ou imunoadesinas em MT-103 (um anticorpo de cadeia simples bispecífico CD19/CD3; Hoffman, P. et al. 2005. Int. J. Cancer. 115: 98-104; Schlereth, B. et al. 2006. Cancer Immunol. Immunother. 55: 503-514), um diacorpo

CD19/CD16 (Schlenzka, J. et al. 2004. Anti-cancer Drugs. 15: 915-919; Kipriyanov, S.M- et al. 2002. J. Immunol. 169: 137-144), BU12-saporin (Flavell, D.J. et al. 1995. Br. J. Cancer. 72: 1373-1379), e anti-CD19-idarubicina (Rowland, A.J. et al. 1993. Cancer Immunol. Immunother. 55: 503-514); Olson, US Pub. No. 2004/0136908A1, registada em 4 de março, 2004; US 5,686,072; Olson, WO 02/080987A1, registada em 29 de março, 2002; Tedder, WO 06/133450A1, registada em 8 de junho, 2006; Tedder, WO 06/121852A2, registada em 5 de abril, 2006; Tedder, WO 06/089133A2, registada em 15 de fev., 2006; Tedderm US Pub. No. 2006/280738A1, registada em 8 de jun., 2006; US 7,109,304; Hansen, US Pub. No. 2005/070693A1, registada em 2 de agosto., 2004; Hansen, US Pub. No. 2006/257398A1, registada em 1 de jun., 2006; Hansen, WO 05/012493A2, registada em 2 de agosto., 2004; Rao-Naik, WO 07/002223A2, registada em 20 de jun., 2006; Page, US Pub. 2002/182208A1, registada em 16 de maio, 2002; US 5,686,072; Page, EP00481790B1, registada em 17 de out., 1991; Hariharan, US Pub. No. 2003/103971A1, registada em 12 de set., 2002; Goldenberg, US Pub. No. 2003/133930A1, registada em 24 de jan., 2003; Goldenberg, US Pub. No. 2004/219156A1, registada em 30 dez., 2002; Hahharan, US Pub. No. 2007/0009519A1, registada em 21 de jul., 2006; Curd, WO 00/067796A1, registada em 4 de maio, 2000; Kipriyanov, WO 03/088998A1, registada em 15 de abr., 2003; US 7,112,324, US 7,129,330, Olson, US Pub. No. 2004/013690A1, registada em 4 de mar., 2004; Darken, US Pub. No. 2006/0193852A1, registada em 5 de maio, 2006; Amphlett, US Pub. No. 2007/0009541A1, registada em 14 de set., 2006; Kersey, WO 96/36360A1, registada em 15 de maio, 199E; Kufer, WO 04/106381A1, registada em 26 de maio, 2004; Little, US Pub. No. 2007/031436A1, registada em 10 de out., 2006; Kufer, US Pub. No. 2007/123479A1, registada em 26 de maio, 2004; Baeuerle, WO 07/068354A1, registada em 29 de nov., 2006; Le Gall, EP 01314741B1, registada 14 de nov.,

2001; Pesando, WO 91/13974A1, registada em 12 de mar., 1991; /Alien et al, Clin. Cancer. Res 2005; 11(9) 1 de maio, 2005; Barbins et al, J. Immunother, Vol. 29, No.2, março/abril 2006; Bruenke et al, Brit. J. Haem, 130, 218-2228 (2005); Callard, J. Immunol. Vol. 148, 2983-2987, No. 10, 15 de maio, 1992; Carter et al, Immunol. Res. 2002; 26/1-3:45-54; Carter & Barrington, Cuir. Dir. Autoimmun. Basel, Karger, 2004, vol 7, pp 4-32; WWWK Cheng et al, Biochim. Biophys. Acta 1768 (2007) 21-29; Cochlovius, Cancer Res. 60, 4336-4341, 15 de agosto., 2000; LJN Cooper et al, Blood Cells, Molecules & Diseases, 33 (2004) 83-89; LJN Cooper et al, Blood, 15 de fev. 2005, Vol. 105, No. 4, pp 1622-1631; Culton et al, J. Clin. Immunol., Vol. 27, No. 1, jan. 2007; Daniel et al, Blood, Vol. 92, No. 12 (15 dez.), 1998: pp 4750-4757; Doody et al, Curr. Opin. Immun., 1996, pp 378-382; Dreier et al, Int. J. Cancer, 100, 690-697 (2002); Dreier et al, J. Immunol., 2003, pp. 4397-4402; Fearon & Carter, Annu. Rev. Immunol. 1995. 13:127-149; Fearon & Carroll, Annu. Rev. Immunol. 2000. 18:393-422; Fujimoto & Sato, J. Dermatol. Sci. (2007) em impressão; Le Gall et al, Prot. Engr, Des. & Select., vol. 17, no. 4, pp.357-366, 2004; Ghetie et al, Blood, 1 de jul 2004, Vol. 104, No. 1, pp.178-183; Ghetie et al, Blood, Vol. 83, No. 5 (Mar 1), 1994: pp 1329-1336; Ghetie et al, Clin. Cancer Res., Vol. 5, 3920-2927, Dec. 1999; Ginaldi et al, J. Clin. Pathol, 1998; 51:364-369; Grossbard et al, Clin. Cancer Res., Vol. 5, 2392-2398, set. 1999; Grossbard et al, Brit. J. Haematol., 1998, 102, 509-515; Grossbard et al, Blood, Vol. 80, No. 4 (15 de Agosto), 1992: pp 863-878; Grossbard & Fidias, Clin. Immunol. & Immunolpath., Vol. 76, No. 2, agosto., pp. 107-114, 1995; M. Green, Cancer Immunol. Immunother. (2004) 53: 625-632; Harata et al, Blood, 1 set. 2004, Vol. 104, No. 5, pp1442-1449; Hekman et al, Cancer Immunol. Immunother. (1991) 32: 364-372; Hoffmann et al, Int. J. Cancer: 115, 98-104 (2005); Kipriyanov et al, J.

Immunol. (2002), pp. 138-144; Kipriyanov et al, Int. J. Cancer: 77, 763-772 (1998); Kipriyanov et al, J. Immunol. Meth 196 (1996) 51-62; Lang et al, Blood, 15 maio 2004, Vol. 103, No. 10, pp 3982-3985; Lankester et al, J. Biol. Chem., Vol, 271, No. 37, set. 13, pp. 22326-22330, 1996; Loeffler et al, Blood, 15 mar 2000, Vol. 95, No. 6, pp 2098-2103; Masir, et al Histopathol., 2006, 48, pps. 239-246; Bargou et al, MT103 (MEDI-538) Poster; Mitchell et al, J. Nucl. Med. 2003; 44:1106-1112; Molhoj et al, Molec. Immunol., 44 (2007) 1935-1943; Pietersz et al, Cancer Immunol. Immunother (1995) 41: 53-60; Sapra et al, Clin. Cancer Res. Vol. 10, 1100-1111, fev. 1, 2004; Schlereth et al, Cancer Immunol. Immunother. (2006) 55: 503-514; Schwemmlein et al, Leukemia (2007) 21, 1405-1412; Sieber et al, Brit. J. Haematology, 2003, 121, 458-461; Stone et al, Blood, Vol, 88, No. 4 (agosto 15), 1996: 1188-1197; Sun et al, Molec. Immunolog. 41 (2004) 929-938; Tedder & Isaacs, J. Immunolog. Vol. 143, 712-717, No. 2 jul 15, 1989; Tedder et al, Curr. Dir. Autoimmun. Basel, Karger, 2005, vol 8, pp 55-90; Tedder et al, Springer Semin. Immun. (2006) 28: 351-364; Tiroch et al, J. Immunol., 2002, 168: 3275-3282; Uckun et al, Blood, Vol 71, No 1 (jan), 1988: pp 13-29; Uckun et al, J. Immunol., Vol 134, No 3, março 1985, pp 2010-2016; Vallera et al, Clin. Cancer Res. 2005; 11(10) mai 15, 2005; Vlasveld et al, Cancer Immunol. Immunother (1995) 40: 37-47; Vuist et al, Cancer Res, 49, 3783-3788, julho 15, 1989; Vuis et al, Cancer Res, 50, 5767-5772, set. 15, 1990; Yan et al, Int. Immunol. Vol 17, No. 7, pp 869-877 (2005); Yazawa, et la, PNAS 2005; 102; 15178-15183. As moléculas descritas nas US 5,686,072, WO 02/080987A1 e US Pub. No. 2004/0136908A1 e identificadas como 4G7, as moléculas descritas na WO 1007/002223A2 e Tedder, são preferidas.

Os anticorpos da presente invenção podem encontrar aplicação numa vasta gama de produtos. Numa forma de

realização os anticorpos da invenção são um terapêutico, um diagnóstico, ou um reagente de pesquisa, preferencialmente um terapêutico. Um anticorpo da presente invenção pode encontrar aplicação numa composição de anticorpo que é monoclonal. Os anticorpos da presente invenção podem ser antagonistas, neutralizantes ou inibidores. Numa forma de realização preferida, os anticorpos da presente invenção são usados para matar células alvo que suportam o antígeno alvo, por exemplo células cancerígenas. Numa forma de realização alternativa, os anticorpos da presente invenção são usados para bloquear ou antagonizar o antígeno alvo. Numa forma de realização preferida alternativa, os anticorpos da presente invenção são usados para bloquear ou antagonizar o antígeno alvo e matar as células alvo que suportam o antígeno alvo.

Anticorpos anti-CD 19 como terapêuticas para tratar distúrbios das células B

Os anticorpos são uma classe de proteínas terapêuticas que podem ser usados para tratar distúrbios das células B. Um certo número das propriedades favoráveis de anticorpos, incluindo mas não limitado a especificidade para o alvo, capacidade para mediar mecanismos efetores imunitários, e longa vida no soro, torna os anticorpos terapêuticas poderosas. A presente invenção descreve anticorpos como definido nas reivindicações contra as células B de antígeno CD 19.

As células B de antígeno CD19 (CD19, também conhecido como antígeno B4 da superfície das células B, Leu-12) é um marcador de superfície de pan-célula B humana que é expressa a partir de estádios precoces de desenvolvimento da pré-célula B através de diferenciação do terminal nas células plasmáticas. O CD19 promove a proliferação e

sobrevivência de células B maduras. Associa-se num complexo com CD21 na superfície celular. Também se associa com CD81 e Leu-13 e potencia a sinalização das células B recetora (RCB). Em conjunto com RCB, o CD 19 modula a sinalização intrínseca e a induzida por recetor antigénio limite crítico para a expansão clonal de células B e imunidade humoral. Em colaboração com CD21 liga o sistema imunitário inato e adaptativo. Após a ativação, a cauda citoplasmática do CD19 torna-se fosforilada o que leva a ligação pela família das Src quinases e recrutamento da PI-3 quinase. É um alvo de imunoterapia atraente para cancros de origem linfóide uma vez que é também expresso na vasta maioria das células LNH assim como algumas leucemias.

Um certo número de anticorpos ou conjugados de anticorpos que visam CD19 foram avaliados em estudos pré-clínicos ou em ensaios clínicos para o tratamento de cancros. Estes anticorpos anti-CD 19 ou conjugados de anticorpo incluem mas não são limitados a MT-103 (um anticorpo CD19/CD3 biespecífico de cadeia simples; Hoffman et al, 2005 Int J Cancer 115:98-104; Schlereth et al, 2006 Cancer Immunol Immunother 55:503-514), um diacorpo CD19/CD16 (Schlenzka et al, 2004 Anti-cancer Drugs 15:915-919; Kipriyanov et al, 2002 J Immunol 169:137-144), BU12-saporin (Flavell et al, 1995 Br J Cancer 72:1373-1379), e anti-CD19-idarubicina (Rowland et al, 1993 Cancer Immunol Immunother 55:503-514).

Otimização Fc de anticorpos anti-CD19

Há um certo número de mecanismos caracterizados através dos quais os anticorpos medeiam efeitos celulares, incluindo antiproliferação via bloqueio de vias de crescimento necessários, de sinalização intracelular conduzindo à apoptose, regulação negativa reforçada e/ou renovação dos recetores, citotoxicidade dependente do complemento (CDC),

citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (CMCA), fagocitose mediada por células dependente anticorpo (FCDA) e promoção de uma resposta imune adaptativa (Cragg et al., 1999, *Curr Opin Immunol* 11:541-547; Glennie et al., 2000, *Immunol Today* 21:403-410). A eficácia de anticorpo pode ser devido a uma combinação destes mecanismos, e sua importância relativa na terapia clínica para a oncologia parece ser dependente de cancro.

A importância de funções efetoras mediadas por FcγR para a atividade de alguns anticorpos foi demonstrada em ratinhos (Clynes et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:652-656; Clynes et al., 2000, *Nat Med* 6:443-446), e através de correlações observadas entre eficácia clínica em humanos e o seu alotipo de formas de alta (V158) ou baixa (F158) afinidade polimórfica de FcγRIIIa (Cartron et al., 2002, *Blood* 99:754-758; Weng & Levy, 2003, *Journal of Clinical Oncology*, 21:3940-3947). Juntamente estes dados sugerem que um anticorpo que é otimizado para ligar a certos FcγRs podem mediar melhor as funções efetoras, e deste modo destruir as células alvo mais efetivamente em doentes. Assim, um meio promissor para melhorar a potência antitumoral de anticorpos é através do aumento da sua capacidade para mediar funções efetoras citotóxicas tais como CMCA, FCDA, e CDC. Adicionalmente, os anticorpos podem mediar mecanismos anti-tumorais através da inibição de crescimento ou sinalização apoptótica que pode ocorrer quando um anticorpo se liga ao seu alvo nas células tumorais. Essa sinalização pode ser potenciada quando os anticorpos são apresentados para as células do tumor ligados a células imunitárias via FcγR. Portanto o aumento da afinidade dos anticorpos para FcγRs pode resultar melhorias nos efeitos anti-proliferativos.

A manipulação do anticorpo para otimizar a função efetora foi alcançada usando modificações de aminoácidos (ver por exemplo a US 2004/0132101 e US 2006/0024298 e referências aí citadas), e as glicoformas manipuladas (ver por exemplo Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473, Yamane-Ohnuki et al., 2004, Biotechnology and Bioengineering 87(5):614-621).

Modificações para otimização da função efetora

São divulgados anticorpos compreendendo modificações, em que as referidas modificações alteram a afinidade para um ou mais recetores Fc, e/ou alterar a capacidade do anticorpo para mediar uma ou mais funções efetoras. As modificações incluem modificações de aminoácido e modificações de glicoforma.

Modificações de aminoácido

Como descrito na US 2006/0024298, registada em 5 de maio, 2005, intitulada "Optimized Fc Variants", modificações de aminoácido em posições da cadeia pesada da região constante 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 266, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, e 337, permite a modificação das propriedades de ligação a FcγR, função efetora, e propriedades potencialmente clínicas de anticorpos.

Em particular, variantes que alteram a ligação a um ou mais recetores humanos Fc podem compreender um aminoácido 222E,

222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 227E, 227G,
 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y,
 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A,
 233D, 233F, 233G, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q,
 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233Y, 234A, 234D, 234E, 234F,
 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P, 234Q, 234R, 234S,
 234T, 234V, 234W, 234Y, 235A, 235D, 235E, 235F, 235G, 235H,
 235I, 235K, 235M, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V,
 235W, 235Y, 236A, 236D, 236E, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L,
 236M, 236N, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y,
 237D, 237E, 237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237N, 237P,
 237Q, 237R, 237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F,
 238G, 238H, 238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S,
 238T, 238V, 238W, 238Y, 239D, 239E, 239F, 239G, 239H, 239I,
 239K, 239L, 239M, 239N, 239P, 239Q, 239R, 239T, 239V, 239W,
 239Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 241D, 241E, 241L, 241R, 241S,
 241 W, 241 Y, 243E, 243H, 243L, 243Q, 243R, 243W, 243Y,
 244H, 245A, 246D, 246E, 246H, 246Y, 247G, 247V, 249H, 249Q,
 249Y, 255E, 255Y, 258H, 258S, 258Y, 260D, 260E, 260H, 260Y,
 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263A, 263I, 263M, 263T, 264A,
 264D, 264E, 264F, 264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N,
 264P, 264Q, 264R, 264S, 264T, 264W, 264Y, 265F, 265G, 265H,
 265I, 265K, 265L, 265M, 265N, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T,
 265V, 265W, 265Y, 266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F,
 267H, 267I, 267K, 267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267T,
 267V, 267W, 267Y, 268D, 268E, 268F, 268G, 268I, 268K, 268L,
 268M, 268P, 268Q, 268R, 268T, 268V, 268W, 269F, 269G, 269H,
 269I, 269K, 269L, 269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T, 269V,
 269W, 269Y, 270F, 270G, 270H, 270I, 270L, 270M, 270P, 270Q,
 270R, 270S, 270T, 270W, 270Y, 271A, 271D, 271E, 271F, 271G,
 271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271S, 271T,
 271V, 271W, 271Y, 272D, 272F, 272G, 272H, 272I, 272J, 272K,
 272L, 272M, 272P, 272R, 272S, 272T, 272V, 272W, 272Y, 273I,
 274D, 274E, 274F, 274G, 274H, 274I, 274L, 274M, 274N, 274P,
 274R, 274T, 274V, 274W, 274Y, 275L, 275W, 276D, 276E, 276F,

276G, 276H, 276I, 276L, 276M, 276P, 276R, 276S, 276T, 276V,
276W, 276Y, 278D, 278E, 278G, 278H, 278I, 278K, 278L, 278M,
278N, 278P, 278Q, 278R, 278S, 278T, 278V, 278W, 280G, 280K,
280L, 280P, 280W, 281D, 281E, 281K, 281N, 281P, 281Q, 281Y,
282E, 282G, 282K, 282P, 282Y, 283G, 283H, 283K, 283L, 283P,
283R, 283Y, 284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 285D,
285E, 285K, 285Q, 285W, 285Y, 286E, 286G, 286P, 286Y, 288P,
288E, 288Y, 290D, 290H, 290L, 290N, 290W, 291D, 291E, 291G,
291H, 291I, 291Q, 291T, 292D, 292E, 292T, 292Y, 293F, 293G,
293H, 293I, 293L, 293M, 293N, 293P, 293R, 293S, 293T, 293V,
293W, 293Y, 294F, 294G, 294H, 294I, 294K, 294L, 294M, 294P,
294R, 294S, 294T, 294V, 294W, 294Y, 295D, 295E, 295F, 295G,
295H, 295I, 295M, 295N, 295P, 295R, 295S, 295T, 295V, 295W,
295Y, 296A, 296D, 296E, 296G, 296H, 296I, 296K, 296L, 296M,
296N, 296Q, 296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F, 297G,
297H, 297I, 297K, 297L, 297M, 297P, 297Q, 297R, 297S, 297T,
297V, 297W, 297Y, 298A, 298D, 298E, 298F, 298H, 298I, 298K,
298M, 298N, 298Q, 298R, 298T, 298W, 298Y, 299A, 299D, 299E,
299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q,
299R, 299S, 299V, 299W, 299Y, 300A, 300D, 300E, 300G, 300H,
300K, 300M, 300N, 300P, 300Q, 300R, 300S, 300T, 300V, 300W,
301D, 301E, 301H, 301Y, 302I, 303D, 303E, 303Y, 304D, 304H,
304L, 304N, 304T, 305E, 305T, 305Y, 313F, 317E, 317Q, 318H,
318L, 318Q, 318R, 318Y, 320D, 320F, 320G, 320H, 320I, 320L,
320N, 320P, 320S, 320T, 320V, 320W, 320Y, 322D, 322F, 322G,
322H, 322I, 322P, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y, 323I, 324D,
324F, 324G, 324H, 324I, 324L, 324M, 324P, 324R, 324T, 324V,
324W, 324Y, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K,
325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325Y,
326E, 326I, 326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 327I,
327K, 327L, 327M, 327N, 327F, 327R, 327S, 327T, 327V, 327W,
327Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328I, 328K, 328M,
328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D,
329E, 329F, 329G, 329H, 329I, 329K, 329L, 329M, 329N, 329Q,
329R, 329S, 329T, 329V, 329W, 329Y, 330E, 330F, 330G, 330H,

330I, 330L, 330M, 330N, 330P, 330R, 330S, 330T, 330V, 330W, 330Y, 331D, 331F, 331H, 331I, 331L, 331M, 331Q, 331R, 331T, 331V, 331W, 331Y, 332A, 332D, 332E, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332N, 332P, 332Q, 332R, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 333A, 333F, 333H, 333I, 333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334A, 334F, 334I, 334L, 334P, 334T, 335D, 335F, 335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335N, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337E, 337H, e 337N, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

Como descrito na US 2005/0244403, registada em 24 de Março, 2005, intitulada "Immunoglobulin variants outside the Fc region", modificações de aminoácido em posições da cadeia pesada da região constante 118, 119, 120, 121, 122, 124, 126, 129, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 138, 139, 147, 148, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 183, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, e 236, permite a modificação de propriedades de ligação a FcγR, a função efetora, e propriedades potencialmente clínicas de anticorpos.

Como descrito na US 2005/0244403, registada em 24 de março, 2005, intitulada "Immunoglobulin variants outside the Fc region", as modificações de aminoácido nas posições da região constante de cadeia leve 108, 109, 110, 111, 112, 114, 116, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 145, 147, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 176, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 187, 188, 189, 190, 191, 193, 195, 197, 199, 200, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 212,

213, permite a modificação de propriedades de ligação a FcγR, a função efetora, e as propriedades potencialmente clínicas de anticorpos.

Em particular, as variantes que alteram a ligação a um ou mais recetores humanos Fc pode compreender uma modificação de aminoácido na região constante de cadeia pesada, como aqui descrito, selecionado a partir do grupo que consiste de 118K, 118E, 118Y, 119R, 119E, 119Y, 120R, 120E, 120I, 121 E, 121Y, 121H, 122E, 122R, 124K, 124E, 124Y, 126K, 126D, 129L, 129D, 131G, 131T, 132D, 132R, 132L, 133R, 133E, 133L, 135I, 135E, 135K, 136E, 136K, 136I, 137E, 138S, 138R, 138D, 139I, 139E, 139K, 147A, 147E, 148Y, 148K, 150L, 150K, 150E, 151A, 151D, 152L, 152K, 153L, 153D, 155E, 155K, 155I, 157E, 157K, 157Y, 159K, 159D, 159L, 160K, 160E, 160Y, 161D, 162D, 162K, 162Y, 163R, 164R, 164E, 164Y, 165D, 165R, 165Y, 166D, 167A, 168L, 169E, 171G, 171H, 172K, 172L, 172E, 173T, 173D, 174E, 174K, 174Y, 175D, 175L, 176D, 176R, 176L, 177R, 177E, 177Y, 178D, 179K, 179Y, 179E, 180K, 180L, 180E, 183T, 187I, 187K, 187E, 188I, 189D, 189G, 190I, 190K, 190E, 191D, 191R, 191Y, 192N, 192R, 192L, 193F, 193E, 194R, 194D, 195R, 195D, 195Y, 196K, 196D, 196L, 197R, 197E, 197Y, 198L, 199T, 199D, 199K, 201E, 201K, 201L, 203D, 203L, 203K, 205D, 205L, 206A, 206E, 207K, 207D, 208R, 208E, 208Y, 209E, 209K, 209Y, 210L, 210E, 210Y, 211R, 211E, 211Y, 212Q, 212K, 212H, 212L, 212Y, 213N, 213E, 213H, 213L, 213Y, 214N, 214E, 214H, 214L, 214Y, 216N, 216K, 216H, 216L, 216Y, 217D, 217H, 217A, 217V, 217G, 218D, 218E, 218Q, 218T, 218H, 218L, 218Y, 219D, 219E, 219Q, 219K, 219T, 219H, 219L, 219I, 219Y, 205A, 210A, 213A, 214A, 218A, 221K, 221Y, 221E, 221N, 221Q, 221K, 221S, 221T, 221H, 221 A, 221V, 221L, 221I, 221F, 221M, 221W, 221P, 221G, 222E, 222Y, 222D, 222N, 222Q, 222R, 222S, 222T, 222H, 222V, 222L, 222I, 222F, 222M, 222W, 222P, 222G, 222A, 223D, 223N, 223Q, 223R, 223S, 223H, 223A, 223V, 223L, 223I, 223F, 223M, 223Y, 223W, 223P, 223G, 223E, 223K, 224D, 224N, 224Q,

224K, 224R, 224S, 224T, 224V, 224L, 224I, 224F, 224M, 224W, 224P, 224G, 224E, 224Y, 224A, 225D, 225N, 225Q, 225R, 225S, 225H, 225A, 225V, 225L, 225L, 225F, 225M, 225Y, 225P, 225G, 225E, 225K, 225W, 226S, 227E, 227K, 227Y, 227G, 227D, 227N, 227Q, 227R, 227S, 227T, 227H, 227A, 227V, 227L, 227I, 227F, 227M, 227W, 228K, 228Y, 228G, 228D, 228N, 228Q, 228R, 228T, 228H, 228A, 228V, 228L, 228I, 228F, 228M, 228W, 229S, 230A, 230E, 230Y, 230G, 230D, 230N, 230Q, 230K, 230R, 230S, 230T, 230H, 230V, 230L, 230I, 230F, 230M, 230W, 231K, 231P, 231D, 231N, 231Q, 231R, 231S, 231T, 231H, 231V, 231L, 231I, 231F, 231M, 231W, 232E, 232K, 232Y, 232G, 232D, 232N, 232Q, 232R, 232S, 232T, 232H, 232A, 232V, 232L, 232I, 232F, 232M, 232W, 233D, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233H, 233A, 233V, 233L, 233I, 233F, 233M, 233Y, 233W, 233G, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 234K, 234R, 234S, 234A, 234M, 234G, 235D, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 235E, 235K, 235R, 235A, 235M, 235W, 235P, 235G, 236D, 236E, 236N, 236Q, 236K, 236R, 236S, 236T, 236H, 236A, 236V, 236L, 236I, 236F, 236M, 236Y, 236W, e 236P, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

Em particular, as variantes que alteram a ligação a um ou mais recetores humanos Fc podem compreender uma modificação de aminoácido na região constante de cadeia leve, como aqui descrito, seleccionados a partir do grupo que consiste de 108D, 108I, 108Q, 109D, 109P, 109R, 110E, 110I, 110K, 111E, 111K, 111L, 112E, 112R, 112Y, 114D, 114I, 114K, 116T, 121D, 122R, 122S, 122Y, 123L, 123R, 124E, 125E, 125K, 126D, 126L, 126Q, 127A, 127D, 127K, 128N, 129E, 129I, 129K, 131T, 137K, 137S, 138D, 138K, 138L, 140E, 140H, 140K, 141E, 141K, 142D, 142G, 142L, 143A, 143L, 143R, 145D, 145T, 145Y, 147A, 147E, 147K, 149D, 149Y, 150A, 151I, 151K, 152L, 152R, 152S, 153D, 153H, 153S, 154E, 154R, 154V, 155E, 155I, 155K, 156A, 156D, 156R, 157N, 158D, 158L, 158R, 159E, 159K, 159L, 160K, 160V, 161K, 161L, 162T, 163E, 163K, 163T, 164Q, 165K, 165P, 165Y,

166E, 166M, 166S, 167K, 167L, 168K, 168Q, 168Y, 169D, 169H, 169S, 170I, 170N, 170R, 171A, 171N, 171V, 172E, 172I, 172K, 173K, 173L, 173Q, 174A, 176T, 180E, 180K, 180S, 181K, 182E, 182R, 182T, 183D, 183L, 183E, 184E, 184K, 184Y, 185I, 185Q, 185R, 187K, 187Y, 188E, 188S, 188Y, 189D, 189K, 189Y, 190E, 190L, 190R, 191E, 191R, 191S, 193E, 193K, 193S, 195I, 195K, 195Q, 197E, 197K, 197L, 199E, 199K, 199Y, 200S, 202D, 202R, 202Y, 203D, 203L, 203R, 204T, 205E, 205K, 206E, 206I, 206K, 207A, 207E, 207L, 208E, 208K, 208T, 210A, 210E, 210K, 211A, 211E, 211P, 212E, 212K, 212T, 213L, 213R, em que numeração é de acordo com o índice EU.

Substituições adicionais que podem ser usadas incluem outras substituições que modulam a afinidade ao recetor Fc, a função efetora mediada por FcγR, e/ou a função efetora mediada por complemento, incluem mas não são limitados a 298A, 298T, 326A, 326D, 326E, 326W, 326Y, 333A, 333S, 334L, e 334A (US 6,737,056; Shields et al, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604; US 6,528,624; Idusogie et al., 2001, J. Immunology 166:2571-2572), 247L, 255L, 270E, 392T, 396L, e 421K (US 2005/0037000; US 2005/0064514), e 280H, 280Q, e 280Y (US 2004/0002587).

Numa outra forma de realização, os anticorpos aqui descritos podem ser combinados com variantes constantes de cadeia pesada que alteram a ligação FcRn. Estes incluem modificações que modificam a afinidade FcRn de um modo específico de pH. Em particular, as variantes que aumentam a ligação Fc incluem FcRn mas não são limitados a: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346-356, US 2005/0276799, PCT WO 2004/035752, PCT WO 2004/092219, US 2005/0014934, US 2005/0032114, PCT WO 2005/037867, US 2005/0226864), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A,

434A (Shields et al, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604, US 2005/0118174, USA6737056, US 2006/0194291, US 2006/0194957, PCT WO 2006/031370, US 2006/0067930), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, US7083784, PCT WO 1997/034631, PCT WO 2002/060919, US 2006/0198840), 257C, 257M, 257L, 257N, 257Y, 279E, 279Q, 279Y, inserção de Ser a seguir a 281, 283F, 284E, 306Y, 307V, 308F, 308Y 311 V, 385H, 385N, (PCT WO 2006/053301, US 2006/0173170, US 2007/0135620) 204D, 284E, 285E, 286D, e 290E (PCT WO 2005/047327).

Os anticorpos podem compreender modificações isotípicas, que são modificações numa IgG parente com o tipo de aminoácido numa IgG alternativa. Por exemplo como ilustrado na Figura 3, uma variante IgG1/IgG3 híbrida pode ser construída por substituição das posições de IgG1 na região CH2 e/ou CH3 com os aminoácidos da IgG3 nas posições em que dois isotipos diferem. Assim pode ser construída uma variante de anticorpo IgG híbrida que compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo que consiste de: 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R, e 436F. Uma variante híbrida IgG1/IgG2 pode ser construída pela substituição das posições IgG2 na região CH2 e/ou CH3 com aminoácidos de IgG1 nas posições onde os dois isotipos diferem. Assim pode ser construída uma variante de anticorpo IgG híbrido que compreende uma ou mais modificações selecionadas a partir do grupo que consiste de 233E, 234L, 235L, -236G (referente a uma inserção de uma glicina na posição 236), e 327A.

Modificações de glicoforma

Muitos polipéptidos, incluindo anticorpos, são submetidos a uma diversidade de modificações pós translacionais envolvendo as porções hidrato de carbono, tais como a glicosilação com oligossacáridos. Existem vários fatores que podem influenciar a glicosilação. As espécies, tipos de tecidos e células têm, todos, mostrado ser importantes do mesmo modo a que glicosilação ocorre. Além disso, o envolvimento extracelular, através de condições de cultura alteradas tais como concentração de soro, pode ter um efeito direto na glicosilação. (Lifely et al., 1995, *Glycobiology* 5(8): 813-822).

Todos os anticorpos contêm hidrato de carbono em posições conservadas nas regiões constantes da cadeia pesada. Cada isotipo de anticorpo tem uma variedade de distintas estruturas hidrato de carbono ligado a N. Para além do hidrato de carbono ligado à cadeia pesada, até 30% de IgGs humanas têm uma região Fab glicosilada. A IgG tem um único hidrato de carbono biantena ligado a N no Asn297 do domínio CH2. Para IgG a partir de soro ou produzida ex vivo em hibridomas ou células manipuladas, as IgG são heterogêneas em relação ao hidrato de carbono ligado a Asn297 (Jefferis et al., 1998, *Immunol. Rev.* 163: 59-76; Wright et al., 1997, *Trends Biotech* 15:26-32). Para IgG humana, o núcleo oligossacárido normalmente consiste em GlcNAc2Man3GlcNAc, com números diferindo de resíduos externos.

As porções hidrato de carbono dos anticorpos da presente invenção serão descritas relativamente à nomenclatura comumente usada para a descrição de oligossacáridos. Uma revisão da química do hidrato de carbono que usa esta nomenclatura é encontrada em Hubbard et al. 1981, *Ann. Rev. Biochem.* 50:555-583. Esta nomenclatura inclui, por exemplo, Man, que representa manose; GlcNAc, que representa manose 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa manose galactose;

Fuc para fucose; e Glc, que representa manose glucose. Os ácidos siálicos são descritos pela notação abreviada NeuNAc, para o ácido 5-N-acetilneurâmínico, e NeuNGc para 5-glicolilneuramínico.

O termo "glicosilação" significa a ligação de oligossacáridos (hidratos de carbono contendo dois ou mais açúcares simples ligados conjuntamente por exemplo desde dois até cerca de doze açúcares simples unidos conjuntamente) a uma glicoproteína. As cadeias laterais do oligossacárido estão tipicamente ligadas à estrutura da glicoproteína através de ligações N ou O. Os oligossacáridos dos anticorpos da presente invenção que ocorrem geralmente estão ligados a um domínio CH2 de uma região Fc como oligossacáridos ligados a N. A "glicosilação ligada a N" refere-se à ligação da porção hidrato de carbono a um resíduo de asparagina numa cadeia de glicoproteína. O especialista na técnica reconhecerá que, por exemplo, cada um dos domínios CH2 das IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 de murino assim como das IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD humanas tem um único sítio para a glicosilação ligada a N no resíduo de aminoácido 297 (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991).

Para os presentes fins, uma "estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro" refere-se a uma estrutura de hidrato de carbono de núcleo processado ligado a uma região Fc a qual geralmente consiste da seguinte estrutura de hidrato de carbono GlcNAc(Fucose)-Glc-NAc-Man-(Man-GlcNAc)₂ típica dos oligossacáridos biantena. A estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro é ligada à região Fc da glicoproteína, geralmente através de ligação N a Asn297 de um domínio CH2 da região Fc. Um "GlcNAc de biseção" é um resíduo GlcNAc ligado à β 1,4 manose da estrutura de hidrato

de carbono de núcleo maduro. o GlcNAc de biseção pode estar ligado enzimaticamente à estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro por uma enzima $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII). As células OHC normalmente não expressam GnTIII (Stanley et al., 1984, J. Biol. Chem. 261: 13370-13378), mas podem ser modificadas nesse sentido (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180).

A presente invenção contempla anticorpos como definido nas reivindicações que compreendem glicoformas modificadas ou glicoformas manipuladas. Por "glicoforma modificada" ou "glicoforma manipulada" como aqui usado entende-se uma composição hidrato de carbono que está ligada covalentemente a uma proteína, por exemplo um anticorpo, em que a referida composição hidrato de carbono difere quimicamente daquela da proteína parente. As glicoformas manipuladas podem ser úteis para vários fins, incluindo mas não limitado a aumentar ou reduzir a função efetora medida por Fc γ R. Os anticorpos da presente invenção podem ser modificados para controlar o nível de oligossacáridos fucosilados e/ou de biseção que estão ligados covalentemente à região Fc.

Historicamente, os anticorpos produzidos em Células de Ovário de Hamster Chinês (OHC), um dos hospedeiros industriais mais usados, contêm cerca de 2 até 6% da população que é não fucosilada. A linha de células YB2/0 (mieloma de rato) e Lec 13 (uma lectina mutante da linha OHC que tem uma GDP-manose 4,6 desidratase deficiente conduzindo à deficiência da GDPfucose ou intermediários açúcar GDP que são o substrato da α 1,6-fucosiltransferase (Ripka et al., 1986), no entanto, pode produzir anticorpos com 78% até 98% espécies não fucosiladas. Infelizmente, a produção de anticorpo a partir destas células é

extremamente pobre e portanto estas linhas de células não são úteis para fazer comercialmente produtos de anticorpos terapêuticos. O gene FUT8 codifica a enzima α 1,6-fucosiltransferase que catalisa a transferência de um resíduo fucosil da GDP-fucose para a posição 6 de GlcNac ligado a Asn (ligado a N) de uma N-glicana (Yanagidani et al., 1997, J Biochem 121:626-632). Sabe-se que a α 1,6-fucosiltransferase é a única enzima responsável pela adição da fucose ao hidrato de carbono biantena ligado a N na Asn297 no domínio CH2 do anticorpo IgG.

São conhecidos vários métodos na técnica para gerar glicoformas modificadas (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277: 26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem. 278:3466-3473); (US 6,602,684; US 2003/0157108; US 2003/0003097; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1); Yamane-Ohnuki et al., 2004, Biotechnology and Bioengineering 87(5):614-621; (Potelligent™ technology [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; GlycoMAb™ glycosilation engineering technology [GLYCART biotechnology AG, Zürich, Switzerland]). Estas técnicas controlam o nível de oligossacáridos fucosilados e/ou de biseção que estão ligados covalentemente à região Fc, por exemplo por expressão de uma IgG em vários organismos ou linhas de células, por manipulação ou de outro modo (por exemplo células Lec-13 OHC ou células de hibridoma rato YB2/0), por regulação enzimática envolvida no passo de glicosilação (por exemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferase] e/ou β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferase III [GnTIII]), ou por modificação do(s) hidrato de carbono(s) após a IgG ter sido expressa.

Outros métodos para modificar as glicoformas dos anticorpos da invenção incluem o uso de estirpes de leveduras glicomanipuladas (Li et al., 2006, Nature Biotechnology 24(2):210-215), musgo (Nechansky et al., 2007, Mol Immunol 44(7): 1826-8), e plantas (Cox et al., 2006, Nat Biotechnol 24(12):1591-7). Métodos para modificar glicoformas incluem mas não são limitados ao uso de uma estirpe glicomanipulada da levedura *Pichia pastoris* (Li et al., 2006, Nature Biotechnology 24(2):210-215), uma estirpe glicomanipulada do musgo *Physcomitrella patens* em que as enzimas β 1,2-xylosiltransferase e/ou α 1,3-fucosiltransferase são eliminadas (Nechansky et al., 2007, Mol Immunol 44(7):1826-8), e o uso de interferência de RNA para inibir alfa-1,3-fucosiltransferase e/ou beta-1,2-xilosiltransferase endógenas na planta aquática *Lemna minor* (Cox et al., 2006, Nat Biotechnol 24(12):1591-7).

Glicoforma modificada ou manipulada tipicamente refere-se ao hidrato de carbono ou oligossacárido diferente; assim por exemplo um anticorpo pode compreender uma glicoforma manipulada. Em alternativa, a glicoforma manipulada pode referir-se ao anticorpo que compreende o hidrato de carbono ou oligossacárido diferente. Para os fins das glicoformas modificadas aqui descritas, um "anticorpo parente" é um anticorpo glicosilado com a mesma sequência de aminoácidos e estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro como uma glicoforma manipulada da presente invenção, exceto que a fucose está ligada à estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro do anticorpo parente. Por exemplo, numa composição compreendendo a parente glicoproteína cerca de 50-100% ou cerca de 70-100% da glicoproteína parente compreendem a estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro com a fucose a ele ligada.

A presente invenção fornece uma composição compreendendo vários dos anticorpos glicosilados como definido nas reivindicações em que cerca de 80-100% do anticorpo na composição compreende a estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro que não possui fucose e o mais preferencialmente, cerca de 90-99% do anticorpo na composição não tem fucose ligada à estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro. O anticorpo aqui descrito na composição pode compreender tanto uma estrutura de núcleo de hidrato de carbono maduro que não possui fucose como adicionalmente compreende pelo menos uma modificação de aminoácido na região Fc. A combinação da glicoforma manipulada e modificação de aminoácido fornece ótimas propriedades de ligação do recetor Fc ao anticorpo.

Propriedades otimizadas de anticorpos

São aqui divulgadas variantes de anticorpo que são otimizadas para um número de propriedades terapeuticamente relevantes. Um anticorpo variante compreende uma ou mais modificações de aminoácido em relação a um anticorpo parente, em que a referida modificação de aminoácido(s) fornece uma ou mais propriedades otimizadas. Portanto os anticorpos podem ser anticorpos variantes. Um anticorpo aqui descrito difere na sequência de aminoácidos do seu anticorpo parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido. Assim os anticorpos variantes têm pelo menos uma modificação de aminoácido comparada com o parente. Em alternativa, os anticorpos variantes podem ter mais que uma modificação de aminoácido em comparação com o parente, por exemplo desde cerca de uma até cinquenta modificações de aminoácido, preferencialmente desde cerca de uma até dez modificações de aminoácido, e mais preferencialmente desde cerca de uma até cerca de cinco modificações de aminoácido em comparação com o parente. Assim as sequências dos

anticorpos variantes e as dos anticorpos parentes são substancialmente homólogos. Por exemplo, as sequências de anticorpo variante aqui possuirão cerca de 80% de homologia com a sequência de anticorpo parente, preferencialmente pelo menos cerca de 90% de homologia, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% de homologia.

Os anticorpos podem compreender modificações de aminoácido que fornecem propriedades de função efetora otimizadas em relação ao parente. Substituições mais preferidas e propriedades de função efetora otimizadas são descritas nas US 2004/0132101, PCT WO 2004/029207, e US 2005/0054832.

Propriedades que podem ser otimizadas incluem mas não são limitadas a afinidade aumentada ou reduzida para um FcγR. Os anticorpos são otimizados para possuir afinidade aumentada para um ativador FcγR humano, preferencialmente FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, e FcγRIIIb, o mais preferencialmente FcγRIIIa. Os anticorpos são otimizados para possuir reduzida afinidade para o recetor inibitório FcγRIIb humano. Estas formas de realização preferidas são antecipadas para fornecer anticorpos com propriedades terapêuticas melhoradas em humanos, por exemplo função efetora melhorada e maior potência anti-tumor. Os anticorpos são otimizados para terem afinidade reduzida ou ablação para um FcγR humano, incluindo mas não limitado a FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, e FcγRIIIb. Estas formas de realização são antecipadas para fornecer anticorpos com propriedades terapêuticas melhoradas em humanos, por exemplo reduzida função efetora e reduzida toxicidade. Os anticorpos fornecem afinidade aumentada para uma ou mais FcγRs, afinidade ainda reduzida para um ou mais de outros FcγRs. Por exemplo, um anticorpo pode ter ligação melhorada a FcγRIIIa, ainda uma ligação reduzida FcγRIIb. Como alternativa, um anticorpo pode ter ligação melhorada a

Fc γ RIIa e Fc γ RI, embora uma ligação reduzida a Fc γ RIIb. Ainda numa outra forma de realização, um anticorpo pode ter afinidade aumentada para Fc γ RIIb, embora uma afinidade reduzida a um ou mais ativadores Fc γ Rs.

A modificação preferencialmente aumenta a afinidade de ligação para um ou mais Fc γ Rs. Por "maior afinidade" ou "afinidade melhorada" ou "afinidade aumentada" ou "melhor afinidade" que uma imunoglobulina parente, como aqui usado entende-se que uma variante Fc se liga a um recetor Fc com uma constante de equilíbrio de associação (KA) significativamente mais elevada ou uma constante de equilíbrio de dissociação (KD) mais baixa que o polipéptido parente quando as quantidades do polipéptido variante e parente no ensaio de ligação são essencialmente a mesma. Por exemplo, a variante Fc com afinidade de ligação Fc γ R melhorada pode apresentar desde cerca de 5 vezes até cerca de 1000 vezes, por exemplo desde cerca de 10 vezes até cerca de 500 vezes de melhoria de afinidade de ligação ao recetor Fc em comparação com o polipéptido parente, onde a afinidade de ligação do recetor Fc é determinada, por exemplo, como divulgado aqui nos Exemplos. Consequentemente, por "afinidade reduzida" em comparação com um polipéptido Fc parente como aqui usado entende-se que uma variante Fc liga um recetor Fc com KA significativamente mais baixa ou KD mais alta que o polipéptido parente.

Os dados no presente estudo indicam que WT IgG1 humano se liga a V158 Fc γ RIIIa humano com uma afinidade de aproximadamente 240 nM (Exemplo 1). Isto é consistente com a literatura que indica que esta ligação é de aproximadamente 200-500 nM, como determinado por Biacore (210 nM como mostrado em Okazaki et al, 2004, J Mol Bio 336:1239-49; 250 nM como mostrado em Lazar et al, Proc Natl

Acad Sci USA 1,03(11):4005-4010) e calorimetria (530 nM, Okazaki et al, 2004, J Mol Bio 336:1239-49). No entanto uma afinidade tão baixa como 750 nM foi medida num estudo (Ferrara et al., 2006, J Biol Chem 281 (8):5032-5036). Apesar de a ligação a F158 FcγRIIIa ser mais baixa do que o ponto de corte 5 μM aplicado no presente estudo, a literatura indica que WT IgG1 humana se liga a F158 FcγRIIIa humano com uma afinidade de aproximadamente 3-5μM, como indicado por calorimetria (2,7 μM, em Okazaki et al, 2004, J Mol Bio 336:1239-49) e Biacore (5,0 μM, Ferrara et al., 2006, J Biol Chem 281(8):5032-5036).

Os anticorpos podem compreender a otimização de ligação Fc a um FcγR humano, no entanto em alternativa os anticorpos podem possuir afinidade aumentada ou reduzida para FcγRs de organismos não humanos, incluindo mas não limitado a roedores e primatas não humanos. Os anticorpos que são otimizados para ligação a um FcγR não humano podem encontrar utilização em experiências. Por exemplo, estão disponíveis modelos de ratinho para uma diversidade de doenças que permitem testar propriedades como a eficácia, toxicidade, e farmacocinética de um dado fármaco candidato. Como é conhecido na técnica, as células cancerígenas podem ser enxertadas ou injetadas em ratinhos mimetizando um cancro humano, um processo referido como xeno enxertos. Testes de anticorpos que compreendem anticorpos que são otimizados para um ou mais FcγRs de ratinho, podem fornecer informação valiosa com vista à eficácia da proteína, o seu mecanismo de ação, e afins. Os anticorpos pode também ser otimizados para aumentar a funcionalidade e/ou propriedade de solução na forma aglicosilada. Os anticorpos glicosilados ligam um ligando Fc com maior afinidade que a forma aglicosilada do anticorpo parente. Os referidos ligandos Fc incluem mas não são limitados a FcγRs, Clq,

FcRn, e proteínas A e G, e pode ser a partir de qualquer fonte incluindo mas não limitado a humanos, ratinhos, ratos, coelhos, ou macacos, preferencialmente humanos. Os anticorpos podem ser otimizados para serem mais estáveis e/ou mais solúveis que a forma aglicosilada do anticorpo parente.

Os anticorpos podem compreender modificações que modulam a interação com outros ligandos Fc que não os FcγRs, incluindo mas não limitado a proteínas de complemento, FcRn, e homólogos de recetor Fc (FcRHs). FcRHs incluem mas não são limitados a FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5, e FcRH6 (Davis et al., 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

Preferencialmente, a especificidade do anticorpo para o ligando Fc irá determinar a sua utilidade terapêutica. A utilidade de um dado anticorpo para fins terapêuticos irá depender do epitopo ou forma do antígeno alvo e a doença ou indicação a ser tratada. Para alguns alvos e indicações, funções efetoras aumentadas mediadas por FcγR podem ser preferidas. Isto pode ser particularmente favorável para anticorpos anticâncer. Assim podem ser usados anticorpos que compreende anticorpos que fornecem afinidade aumentada para ativar FcγRs e/ou afinidade para reduzir FcγRs inibidor. Para alguns alvos e indicações, pode ser também benéfico utilizar anticorpos que fornecem seletividade diferencial para diferentes ativadores FcγRs; por exemplo, em alguns casos pode ser desejada ligação aumentada a FcγRIIa e FcγRIIIa, mas não a FcγRI, enquanto noutros casos, a ligação aumentada somente para FcγRIIa pode ser preferida. Para certos alvos e indicações, pode ser preferível utilizar anticorpos que aumentam tanto as funções efetoras mediadas por FcγR e mediadas por complemento, enquanto para outros casos pode ser vantajoso utilizar anticorpos que aumentam as funções efetoras

mediadas por FcγR ou mediada por complemento. Para alguns alvos ou indicações de cancro, pode ser vantajoso para reduzir ou eliminar a uma ou mais funções efectoras, por exemplo eliminando a ligação a Clq, um ou mais FcγR's, FcRn, ou um ou mais outros ligandos Fc. Para outros alvos e indicações, pode ser preferível utilizar anticorpos que fornecem ligação aumentada a FcγRIIb inibitório, ainda nível WT, reduzido, ou eliminando a ligação a ativadores FcγRs. Isto pode ser particularmente útil, por exemplo, quando o objetivo de um anticorpo é inibir a inflamação ou doença auto-imune, ou modulam o sistema imunitário em alguns modos.

Claramente um importante parâmetro que determina a seletividade mais benéfica de um dado anticorpo para tratar uma dada doença é o contexto do anticorpo, em que o tipo de anticorpo está a ser usado. Portanto a seletividade ou especificidade do ligando Fc de um dado anticorpo irá proporcionar propriedades diferentes dependendo de se compõe um anticorpo ou anticorpos com uma fusão acoplada ou parceiro conjugado. Por exemplo, toxina, radionucleótido, ou outros conjugados podem ser menos tóxicos para células normais se o anticorpo que os compreende tem ligação reduzida ou eliminada de um ou mais ligandos Fc. Como outro exemplo, a fim de inibir a inflamação ou doença auto-imune, pode ser preferível utilizar um anticorpo com afinidade aumentada para ativar FcγRs, tais como para ligar estes FcγRs e prevenir a sua ativação. Por outro lado, um anticorpo que compreende duas ou mais regiões Fcs com afinidade FcγRIIb aumentada pode coenvolver este recetor na superfície das células imunitárias, inibindo deste modo a proliferação destas células. Se em alguns casos um anticorpo pode envolver o seu antigénio alvo num tipo de célula no entanto envolver FcγRs em células separadas do antigénio alvo, noutros casos pode ser vantajoso envolver

FcγRs na superfície das mesmas células como o antígeno alvo. Por exemplo, se os anticorpos alvo um antígeno numa célula que também expressa um ou mais FcγRs, pode ser benéfico utilizar um anticorpo que aumenta ou reduz a ligação a FcγRs na superfície dessa célula. Isto pode ser o caso, por exemplo quando o anticorpo está a ser utilizado como um agente anti-cancro, e coenvolvimento do antígeno alvo e FcγR na superfície da mesma célula promove eventos de sinalização dentro da célula que resulta na inibição do crescimento, apoptose, ou outro efeito anti-proliferativo. Em alternativa, o coenvolvimento do antígeno e do FcγR na mesma célula pode ser vantajoso quando o anticorpo está a ser usado para modular o sistema imunitário de vários modos, em que o coenvolvimento do antígeno alvo e FcγR fornece algum efeito proliferativo ou anti-proliferativo. Do mesmo modo, os anticorpos que compreende duas ou mais regiões Fc pode beneficiar dos anticorpos que modulam a seletividade ou especificidade FcγR para envolver FcγRs na superfície da mesma célula.

A especificidade do ligando Fc dos anticorpos aqui descritos pode ser modulada para criar diferentes perfis de função efetora que podem ser adequados para epitopos de antígenos específicos, indicações ou populações de doentes. A Figura 5 descreve várias formas de realização preferidas dos perfis de ligação ao recetor que incluem melhorias de, reduções de ou sem efeito para a ligação a vários recetores, onde tais alterações podem ser benéficas em determinados contextos. Os perfis de ligação ao recetor na Figura 5 podem variar no grau de aumento ou diminuição dos recetores específicos. Adicionalmente, as alterações de ligação podem ser especificadas no contexto de alterações adicionais de ligação a outros recetores tais como C1q ou FcRn, por exemplo através da combinação com a eliminação de ligação a C1q para desligar a ativação do complemento, ou

através da combinação de ligação aumentada Clq para aumentar a ativação do complemento. São possíveis outras formas de realização com outro perfil de ligação a recetor, os perfis de ligação a recetores enumerados são exemplificativos.

A presença de diferentes formas polimorfas de FcγRs fornece no entanto outro parâmetro que afeta a utilidade terapêutica dos anticorpos aqui descritos. Considerando que a especificidade e seletividade de um dado anticorpo para as diferentes classes de FcγRs afeta significativamente a capacidade de um anticorpo para atingir o antigénio para o tratamento de uma dada doença, a especificidade ou seletividade de um anticorpo para diferentes formas polimorfas destes recetores pode em parte determinar qual a investigação ou experiências pré-clínicas que podem ser apropriados para testar, e em última análise, quais as populações de doentes que podem ou não responder ao tratamento. Assim a especificidade ou seletividade de anticorpos para polimorfismo de ligando Fc, incluindo mas não limitado a polimorfismos FcγR, Clq, FcRn, e FcRH, pode ser usado para guiar a seleção de investigação válida e experiências pré-clínicas, definição de ensaios clínicos, seleção de doentes, dependência de dosagem, e/ou outros aspetos relativos aos ensaios clínicos.

Outras modificações

Os anticorpos aqui descritos podem compreender uma ou mais modificações que fornecem propriedades otimizadas que não são especificamente relacionadas com a função efetora per se. As referidas modificações podem ser modificações de aminoácido, ou podem ser modificações que são feitas enzimaticamente ou quimicamente. Tal modificação(ões) fornecem igualmente alguma melhoria no anticorpo, por

exemplo um aumento na sua estabilidade, solubilidade, função, ou uso clínico. São admissíveis várias melhorias que podem ser ligadas aos anticorpos aqui descritos, com modificações adicionais.

A região variável de um anticorpo pode ser afinidade amadurecida, isto é dizer que as modificações de aminoácido têm sido feitas nos domínios VH e/ou VL do anticorpo para aumentar a ligação do anticorpo ao seu antígeno alvo. Esses tipos de modificações podem melhorar as cinéticas de associação e/ou de dissociação de ligação ao antígeno alvo. Outras modificações incluem as que melhoram a seletividade para o antígeno alvo vs. alvos alternativos. Estas incluem modificações que melhoram a seletividade para antígeno expressas no alvo vs. células não alvo. Outras melhorias para as propriedades de reconhecimento do alvo podem ser fornecidas por modificações adicionais. Tais propriedades podem incluir, mas não são limitados a, propriedades cinéticas específicas (i.e. cinéticas de associação e dissociação), seletivamente para o alvo específico em relação alvos alternativos, e seletividade para uma forma específica de alvo em relação a formas alternativas. Exemplos incluem variantes de comprimento total versus junção, da superfície celular versus formas solúveis, seletividade para diferentes variantes polimórficas, ou seletividade para formas específicas conformacionais do antígeno alvo.

Os anticorpos aqui descritos podem compreender uma ou mais modificações que fornecem internalização reduzida ou aumentada, de um anticorpo. Os anticorpos podem ser utilizados ou combinados com modificações adicionais com vista a reduzir a internalização celular de um anticorpo que ocorre através da interação com um ou mais ligandos Fc. Deve ser esperado que esta propriedade aumente a função

efetora, e, potencialmente reduza a imunogenicidade dos anticorpos da presente invenção. Em alternativa, os anticorpos podem ser utilizados diretamente ou em combinação com modificações adicionais com vista a aumentar a internalização celular de um anticorpo que ocorre através da interação com um ou mais ligandos Fc. Por exemplo, é usado um anticorpo que fornece ligação aumentada a Fc γ RI, que é expresso nas células dendríticas e precocemente ativo na resposta imunológica. Esta estratégia pode ser melhorada adicionalmente por combinação com modificações adicionais, tanto dentro do anticorpo ou numa ligação de fusão ou parceiro conjugado, que promove o reconhecimento e apresentação de fragmentos de péptidos Fc por moléculas MHC. Espera-se que essas estratégias devem melhorar o processamento do antígeno alvo e, assim, melhorar a antigenicidade do antígeno alvo (Bonnerot and Amigorena, 1999, Immunol Rev. 172:279-84), promover uma resposta imune adaptativa e maior mortalidade da célula alvo pelo sistema imunitário humano. Estas estratégias podem ser particularmente vantajosas quando o antígeno alvo é libertado da superfície celular. Uma aplicação adicional destes conceitos surge com imunoterapias de vacina idiótipo, nas quais os anticorpos específicos para clone produzidos pelas células do linfoma dos doentes são usados para vacinar o doente.

As modificações são feitas para melhorar as propriedades biofísicas dos anticorpos, incluindo mas não limitado a estabilidade, solubilidade, e estado oligomérico. As modificações podem incluir, por exemplo, substituições que fornecem mais interações intramoleculares favoráveis no anticorpo tais como para fornecer maior estabilidade, ou substituição de aminoácidos não polares expostos com aminoácidos polares de maior solubilidade. Um certo número de objetivos e métodos de otimização são descritos na US

2004/0110226, que podem encontrar uso para aplicar modificações adicionais para otimizar adicionalmente os anticorpos. Os anticorpos podem também ser combinados com modificações adicionais que reduzem o estado oligomérico ou tamanho, de modo a que a penetração no tumor seja aumentado, ou As taxas de depuração in vivo são aumentadas como desejado.

Outras modificações dos anticorpos incluem aqueles que permitem a formação específica ou moléculas homodiméricas ou homomultiméricas. Essas modificações incluem mas não são limitadas uns dissulfetos manipulados, assim como modificações químicas ou métodos de agregação que podem proporcionar um mecanismo para gerar homodimérico ou homomultímeros covalentes. Por exemplo, métodos de manipulação e composições dessas moléculas são descritos em Kan et al., 2001, J. Immunol., 2001, 166: 1320-1326; Stevenson et al., 2002, Recent Results Cancer Res. 159: 104-12; US 5,681,566; Caron et al., 1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195, e Shopes, 1992, J. Immunol. 148(9):2918-22. Modificações adicionais às variantes incluem aquelas que permitem a formação específica ou heterodimérica, heteromultimérica, bifuncional, e/ou moléculas multifuncionais. Essas modificações incluem, mas não são limitados a, uma ou mais substituições de aminoácidos no domínio CH3, no qual as substituições reduzem a formação de homodímero e aumentam a formação de heterodímero. Por exemplo, métodos de manipulação e composições dessas moléculas são descritos em Atwell et al., 1997, J. Mol. Biol. 270(1): 26-35, e Carter et al., 2001, J. Immunol. Methods 248:7-15. Modificações adicionais incluem modificações na articulação e domínios CH3, nos quais as modificações reduzem a tendência para formar dímeros.

Os anticorpos aqui descritos podem compreender modificações que removem sítios de degradação proteolítica. Estes podem incluir, por exemplo, sítios de protease que reduzem o rendimento de produção, assim como sítios de protease que degradam a proteína administrada *in vivo*. São feitas modificações adicionais para remover sítios de degradação covalentes tais como sítios de desaminação (i.e. desaminação de resíduos de glutaminilo e asparaginilo nos correspondentes resíduos de glutamilo e aspartilo), oxidação, e degradação proteolítica. Os sítios de desaminação que são particularmente úteis remover são aqueles que têm maior propensão para a desaminação, incluindo, mas não limitado a resíduos de asparaginilo e glutamilo seguidos por glicinas (motivos NG e QG, respetivamente). Nesses casos, a substituição de qualquer resíduo pode reduzir significativamente a tendência para a desaminação. Sítios comuns de oxidação incluem resíduos de metionina e cisteína. Outras modificações covalentes, que podem ser tanto introduzidas como removidas, incluem hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos de serilo ou treonilo, metilação de α -grupos amina de cadeias laterais de lisina, arginina, e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilação da amina N-terminal, e amidação de qualquer grupo carboxilo C-terminal. Modificações adicionais podem também incluir mas não são limitadas a modificações pós-translacionais tais como glicosilação e fosforilação ligada a N ou ligada a O.

As modificações podem incluir aquelas que melhoram a expressão e/ou os rendimentos de purificação a partir de hospedeiros ou células hospedeiras comumente usadas na produção de produtos biológicos. Estas incluem, mas não são limitadas a várias linhas de células de mamíferos (por

exemplo OHC), linhas de células de leveduras, linhas de células bacterianas, e plantas. As modificações adicionais incluem modificações que removem ou reduzem a capacidade das cadeias pesadas formarem ligações dissulfeto intercadeia. As modificações adicionais incluem modificações que removem ou reduzem a capacidade das cadeias pesadas para formar ligações dissulfeto intracadeia.

Os anticorpos podem compreender modificações que incluem o uso de aminoácidos não naturais incorporados usando, por exemplo, as tecnologias desenvolvidas por Schultz e colegas, incluindo mas não limitado aos métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(2):7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3, e Chin et al., 2003, Science 301(5635):964-7. Estas modificações permitem a manipulação de várias propriedades funcionais, biofísicas, imunológicas, ou as propriedades de produção discutidas acima. Estas modificações permitem modificações químicas adicionais para outros fins. Outras modificações são aqui contempladas. Por exemplo, o anticorpo da invenção pode ser ligado a uma diversidade de polímeros não proteico, por exemplo, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol. Modificações de aminoácidos adicionais podem ser feitas para permitir modificação química postranslacional específica ou não específica ou dos anticorpos. Tais modificações, incluem, mas não são limitadas a PEGilação e glicosilação. Substituições específicas que podem ser utilizadas para permitir a PEGilação incluem, mas não são limitadas a, introdução de novos resíduos de cisteína ou aminoácidos não naturais de modo a que químicas de acoplamento eficientes e específicas possam ser usadas para ligar um PEG ou de outra

forma uma porção polimérica. A introdução de sítios de glicosilação específicos pode ser obtida por introdução de novas sequências N-X-T/S nos anticorpos.

Modificações covalentes de anticorpos da presente invenção podem ser feitas postranslacionalmente. Por exemplo, vários tipos de modificações covalentes do anticorpo são introduzidos numa molécula reagindo o resíduo de aminoácidos específico do anticorpo com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais selecionadas ou os resíduos N- ou C-terminais.

A modificação covalente dos anticorpos da invenção pode compreender a adição de um ou mais marcadores. O termo "grupo marcador" significa qualquer marcador detetável. O grupo marcador pode ser ligado ao anticorpo por meio de braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir impedimento estérico potencial. São conhecidos na técnica vários métodos para proteínas de marcação e podem ser usados na realização da presente invenção. Em geral, os marcadores caem numa variedade de classes, dependendo do ensaio no qual são para ser detectados: a) marcadores isotópicos, que podem ser radioativos ou isótopos pesados; b) marcadores magnéticos (por exemplo, partículas magnéticas); c) porções ativas redox; d) corantes óticos; grupos enzimáticos (por exemplo peroxidase de rábano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina); e) grupos biotinilados; e f) epitopos de polipéptidos pré-determinados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências pares zipper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metais, marcadores de epitopo, etc.). O grupo marcador pode ser ligado ao anticorpo por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial. Vários métodos para marcação de proteínas são conhecidos na

técnica e podem ser usados na realização da presente invenção. Marcadores específicos incluem corantes óticos, incluindo, mas não limitado a, cromóforos, fósforos e fluoróforos, sendo os últimos específicos em muitos casos. Os fluoróforos podem ser ou "pequena molécula" flúores, ou flúores proteicos. Por "marcador fluorescente" entende-se qualquer molécula que pode ser detetada através das suas inerentes propriedades fluorescentes.

Conjugados e fusões de anticorpo

Os anticorpos da invenção podem ser "proteínas de fusão" de anticorpo, algumas vezes referidas aqui como "conjugados de anticorpo". O parceiro de fusão ou parceiro conjugado pode ser proteico ou não proteico; o último sendo geralmente gerado usando grupos funcionais no anticorpo e no parceiro conjugado. Os parceiros de fusão e conjugados podem ser qualquer molécula, incluindo compostos químicos de moléculas pequenas e polipéptidos. Por exemplo, vários conjugados de anticorpo e métodos são descritos em Trail et al., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:584-588. Possíveis parceiros conjugados incluem mas não são limitados a citocinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agente quimioterapêutico, agentes antiangiogénicos, inibidores da tirosina quinase, e outros agentes terapeuticamente ativos. Os parceiros conjugados podem ser pensados mais como cargas úteis, quer dizer que o objetivo de um conjugado é direcionado a entrega do parceiro conjugado à célula alvo, por exemplo uma célula de cancro ou célula imune, pelo anticorpo. Assim, por exemplo, a conjugação de uma toxina a um anticorpo visa a aplicação da referida toxina a células expressando o antigénio alvo. Como será apreciado por um especialista na técnica, na realidade os conceitos e definições de fusão e conjugado são sobreposição. A designação de um anticorpo como uma

fusão ou conjugado não é para o limitar a qualquer forma de realização particular da presente invenção. Pelo contrário, estes termos são usados vagamente para transmitir o conceito amplo de que qualquer anticorpo da presente invenção pode estar geneticamente, quimicamente, ou de outro modo ligado, a um ou mais polipéptidos ou moléculas para dar alguma propriedade desejada.

Conjugados adequados incluem, mas não são limitados a, marcadores como descrito a seguir, fármacos e agentes citotóxicos incluindo, mas não limitado a, fármacos citotóxicos (por exemplo, agentes quimioterapêuticos) ou toxinas ou fragmentos ativos dessas toxinas. Toxinas adequadas e os seus correspondentes fragmentos incluem cadeia A difteria, cadeia A exotoxina, cadeia A rícino, cadeia A abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina e semelhantes. Os agentes citotóxicos incluem também radioquímicos obtidos por conjugação de radioisótopos aos anticorpos, ou ligação de um radionuclídeo a um agente quelante que tenha sido ligado covalentemente ao anticorpo. Formas de realização adicionais utilizam caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina, e duocarmicinas e análogos; para estes últimos, ver U.S. 2003/0050331.

Os anticorpos da presente invenção podem ser fundidos ou conjugados a uma citocina. Por "citocina" como aqui usado entende-se um termo genérico para proteínas libertado por uma população de células que atuam noutra célula como mediadores intercelulares. Por exemplo, como descrito em Penichet et al., 2001, J. Immunol. Methods 248:91-101, as citocinas podem ser ligadas ao anticorpo para fornecer uma matriz de propriedades desejáveis. Exemplos dessas citocinas são linfoquinas, monoquinas, e hormonas polipéptidos tradicionais. Incluídas entre as citocinas estão hormonas de crescimento tais como hormonas de

crescimento humanas, hormona de crescimento humana N-metionilo, e hormona de crescimento bovino; hormona paratiróide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteínas tais como hormona estimulante de folículo (HEF), hormona estimulante da tiróide (TSH), e hormona luteinizante (HL); fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblasto; prolactina; lactogénio placentário; fator alfa e beta de necrose tumoral; substância inibidora mulleriana; péptido associado a gonadotropina de rato; inibitina; activina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fator de crescimento neural tais como FEC-beta; fator de crescimento plaquetário; fator de crescimento transformador (FCTs) tais como FCT-alfa e FCT-beta; fator I e II de crescimento tipo insulina; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferões tais como interferão alfa, beta, e gama; fatores de estimulação de colónia (FEC) tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, um fator de necrose tumoral tal como TNF-alfa ou TNF-beta; C5a; e outros fatores polipeptídicos incluindo LIF e kit ligando (KL). Como aqui usado, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de células recombinantes, os equivalentes biologicamente ativos das citoquinas de sequências nativas.

Os anticorpos da presente invenção podem ser ligados, conjugados, ou operacionalmente ligados a uma toxina, incluindo mas não limitado a toxinas de pequenas moléculas e toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes destas. Por exemplo, várias imunotoxinas e métodos de imunotoxina são descritos em Thrush et al.,

1996, Ann. Rev. Immunol. 14:49-71. Toxinas de pequenas moléculas incluem mas não são limitadas a caliqueamicina, maitansina (US 5,208,020), tricoteno, e CC1065. O anticorpo da invenção pode ser conjugado para uma ou mais moléculas de maitansina (por exemplo cerca de 1 até cerca de 10 moléculas de maitansina por moléculas de anticorpo). A maitansina pode, por exemplo, ser convertida em May-SS-Me a qual pode ser reduzida a May-SH3 e reagida com anticorpo modificado (Chari et al., 1992, Cancer Research 52: 127-131) para gerar um conjugado maitansinóide-anticorpo. Outro conjugado de interesse compreende um anticorpo conjugado a uma ou mais moléculas caliqueamicina. A família de antibióticos caliqueamicina são capazes de produzir quebras de DNA de cadeia dupla a concentrações sub-picomolares. Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser usadas incluem mas não são limitados a γ_1^1 , α_2^1 , α_3 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG, e Θ_1^1 , (Hinman et al., 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode et al., 1998, Cancer Research 58:2925-2928) (US 5,714,586; US 5,712,374; US 5,264,586; US 5,773,001). 10 análogos de dolastatina tais como auristatina E (AE) e monometilauristatina E (MMAE) podem ser usados como conjugados para os anticorpos da presente invenção (Doronina et al., 2003, Nat Biotechnol 21(7):778-84; Francisco et al., 2003 Blood 102(4):1458-65). Toxinas úteis enzimaticamente ativas incluem mas não são limitadas a cadeia A de difteria, fragmentos ativos não ligantes de toxinas de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricino, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Ver, por exemplo, PCT WO 93/21232. Pode também ser contemplado um conjugado entre um anticorpo da

presente invenção e um composto com atividade nucleolítica, por exemplo uma ribonuclease ou DNA endonuclease tal como uma deoxiribonuclease (Dnase).

Um anticorpo da presente invenção pode ser ligado, conjugado, ou operacionalmente ligado a um radioisótopo para formar um radioconjugado. Uma variedade de isótopos radioativos estão disponíveis para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem, mas não são limitados a, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, e isótopos radioativos de Lu.

Um anticorpo da presente invenção pode ser conjugado a um "recetor" (tal como estreptavidina) para utilização em pré-direcionamento a tumor em que o conjugado anticorpo-recetor é administrado ao doente, seguido por remoção do conjugado não ligado da circulação usando um agente de aclaramento e depois administração de um "ligando" (por exemplo avidina) que é conjugada a um agente citotóxico (por exemplo a radionucleótido). O anticorpo pode ser conjugado ou operacionalmente ligado a uma enzima com vista a empregar a Terapia Pró-fármaco Mediada por Enzima Dependente de Anticorpo (ADEPT). A ADEPT pode ser usada através de conjugação ou ligação operacional a anticorpo para uma enzima ativadora de pró-fármaco que converte um pró-fármaco (por exemplo um agente quimioterapêutico peptídico, ver PCT WO 81/01145) num fármaco anti-cancro ativo. Ver, por exemplo, PCT WO 88/07378 e US 4,975,278. O componente enzimático do imunconjugado útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de atuar num pró-fármaco de modo a cobrir a sua forma citotóxica mais ativa. Enzimas que são úteis no método incluem mas não são limitados a fosfatase alcalina útil para converter pró-fármacos contendo fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil para converter pró-fármacos contendo sulfato em fármacos livres; citosina

deaminase útil para converter 5-fluorocitosina não tóxica num fármaco anti cancro, 5-fluorouracilo; proteases, tais como protease serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis para converter pró-fármacos contendo péptido em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para converter pró-fármacos que contêm substituintes D-aminoácido; enzimas de clivagem de hidrato de carbono tais como beta-galactosidase e neuramimidase útil para converter pró-fármacos glicosilados em fármacos livres; beta-lactamase úteis para converter fármacos derivatizados com .alfa.- lactâmicos em fármacos livres; e penicilina amidases, tais como penicilina V amidase ou penicilina G amidase, úteis para converter fármacos derivatizados na sua azotos de amina com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respetivamente, em fármacos livres. Em alternativa, os anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como "abzimas", podem ser usados para converter os pró-fármacos em fármacos ativos livres (ver, por exemplo, Massey, 1987, Nature 328: 457-458). Conjugados anticorpo-abzima podem ser preparados para libertação da abzima para uma população de células tumorais. Vários conjugados adicionais podem ser contemplados para os anticorpos da presente invenção. Vários agentes quimioterapêuticos, agentes antiangiogénicos, inibidores de quinase de tirosina, e outros agentes terapêuticos são descritos abaixo, os quais podem encontrar uso como conjugados de anticorpo.

Também contemplados como conjugados de fusão e parceiros são os polipéptidos Fc. Assim um anticorpo pode ser um polipéptido multimérico Fc, compreendendo duas ou mais regiões Fc. A vantagem de uma tal molécula é que ele fornece múltiplos sítios de ligação para os recetores Fc com uma única molécula de proteína. As regiões Fc podem ser

ligadas usando uma abordagem de manipulação química. Por exemplo, os Fab's e Fc's podem ser ligados por ligações tioéter originando os resíduos de cisteína nas articulações, gerando moléculas tais como FabFc2. As regiões Fc podem ser ligadas usando manipulação disulfeto e/ou ligação química cruzada. As regiões Fc podem ser ligadas geneticamente. As regiões Fc num anticorpo são ligadas geneticamente às regiões Fc geradas ligadas em tandem como descrito na US 2005/0249723, registada em 12/21/2004, intitulada "Fc polipeptides with novel Fc ligand binding sites,". Os polipéptidos Fc ligados em tandem podem compreender duas ou mais regiões Fc, preferencialmente uma até três, mais preferencialmente duas regiões Fc. Pode ser vantajoso explorar um certo número de construções manipuladas com vista a obter anticorpos ligados como homo- ou heterotandem com as propriedades estruturais e funcionais mais favoráveis. Os anticorpos ligados em tandem podem ser anticorpos ligados em homotandem, ou seja um anticorpo de um isotipo é fundido geneticamente a outro anticorpo do mesmo isotipo. É antecipado que porque existem sítios múltiplos de ligação FcγR, C1q, e/ou FcRn nos polipéptidos Fc ligado em tandem, as funções efectoras e/ou farmacocinéticas pode ser aumentada. Numa forma de realização alternativa, os anticorpos de diferentes isotipos podem ser ligados em tandem, referidos como anticorpos ligados em heterotandem. Por exemplo, devido à capacidade de visar os recetores FcγR e FcαRI, um anticorpo que se liga a ambos FcγRs e FcαRI pode fornecer uma significativa melhoria clínica.

Para além dos anticorpos, uma proteína tipo anticorpo que encontra um papel em expansão na investigação e terapia é uma fusão de Fc (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-

200). "Fusão Fc" é aqui entendido para ser sinónimo dos termos "imunodesina", "fusão Ig", "quimera Ig", e "recetor de globulina" (por vezes com hifens) como usado na técnica anterior (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Uma fusão de Fc é uma proteína em que um ou mais polipéptidos está operacionalmente ligado a Fc. Uma fusão de Fc combina a região Fc de um anticorpo, e assim as suas funções efetoras e farmacocinéticas favoráveis, com a região de ligação ao alvo de um recetor, ligando, ou alguma outra proteína ou domínio de proteína. O papel da última é mediar o reconhecimento do alvo, e assim a sua funcionalidade análoga à região variável de anticorpo. Devido à sobreposição estrutural e funcional das fusões de Fc com os anticorpos, a discussão nos anticorpos da presente invenção estende-se também a Fc.

Virtualmente qualquer proteína ou pequena molécula pode ser ligada a Fc para gerar uma fusão de Fc. Os parceiros da proteína de fusão podem incluir, mas não são limitados à região variável de qualquer anticorpo, a região de ligação a alvo de um recetor, uma molécula adesão, um ligando, uma enzima, uma citocina, uma quimocina, ou alguma outra proteína ou domínio de proteína. Os parceiros das pequenas moléculas de fusão podem incluir qualquer agente terapêutico que dirijam a fusão de Fc para um alvo terapêutico. Tais alvos podem ser qualquer molécula, preferencialmente um recetor extracelular, que esteja implicado na doença.

Os parceiros de fusão e conjugados podem ser ligados a qualquer região de um anticorpo da presente invenção, incluindo nos terminais N ou C, ou no mesmo resíduo entre os terminais. Um parceiro de fusão ou conjugado pode ser ligado ao terminal N ou C do anticorpo, o mais

preferencialmente ao terminal N. Vários ligantes podem encontrar uso na presente invenção para anticorpos ligados covalentemente a um parceiro de fusão ou conjugado. Por "ligante", "sequência ligante", "espaçador", "sequência de amarração" ou equivalentes gramaticais destes, aqui entende-se uma molécula ou grupo de moléculas (tais como um monómero ou polímero) que conecta duas moléculas e serve frequentemente para colocar as duas moléculas numa configuração preferida. Os ligantes são conhecidos na técnica; por exemplo, ligantes homo- ou hetero-bifuncionais como são bem conhecidos (ver, 1994 Pierce Chemical Company Catalog, secção técnica em agentes de reticulação, páginas 155-200). Podem ser usadas várias estratégias para ligar covalentemente as moléculas conjuntamente. Estas incluem, mas não são limitadas a ligações polipéptido entre terminais N e C de proteínas ou domínio de proteínas, ligação através de ligações dissulfureto, e ligação através de reagentes de reticulação química. Num aspeto destas formas de realização, o ligante é uma ligação péptidica, gerada por técnicas recombinantes ou síntese peptídica. O ligante pode conter resíduos de aminoácidos que fornecem flexibilidade. Assim, o péptido ligante pode incluir predominantemente os seguintes resíduos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, ou Thr. O péptido ligante deve ter um comprimento que é adequado para ligar duas moléculas de tal modo que assumam a conformação relativa correta a uma outra de modo que conservem a desejada atividade. Comprimentos adequados para este fim incluem pelo menos um e não mais de 50 resíduos de aminoácidos. Preferencialmente, o ligando é desde cerca de 1 até 30 aminoácidos de comprimento, com os ligantes de 1 até 20 aminoácidos de comprimento sendo os mais preferidos. Ligantes úteis incluem polímeros de glicina-serina (incluindo, por exemplo, (GS) n , (GSGGS) n (GGGGS) n e (GGGS) n , em que n é um número inteiro de pelo menos um), polímeros glicina-alanina, polímeros alanina-

serina, e outros ligantes flexíveis, como será apreciado pelos da técnica. Em alternativa, uma variedade de polímeros não proteicos, incluindo mas não limitado a polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol, podem encontrar utilização como ligantes, que podem encontrar utilização para ligar os anticorpos da presente invenção a um parceiro de fusão ou conjugado, ou para ligar os anticorpos da presente invenção a um conjugado.

Produção de anticorpos

São aqui descritos métodos para produzir e testar anticorpos experimentalmente. Os métodos fornecidos são entendidos para ilustrar geralmente que um ou mais anticorpos podem ser produzidos e testados experimentalmente para obter anticorpos variantes. Métodos gerais para biologia molecular de anticorpo, expressão, purificação, e triagem são descritos em Antibody Engineering, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; e Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76; Antibodies: A Laboratory Manual by Harlow & Lane, Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

Podem ser criados ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da presente invenção, e que podem depois ser clonados nas células hospedeiras, expressas e ensaiadas, se desejado. Assim, os ácidos nucleicos, e particularmente DNA, podem ser feitos de modo a codificar cada sequência de proteína. Estas práticas são realizadas usando procedimentos bem conhecidos. Por exemplo, vários métodos que podem ser úteis são descritos em Molecular Cloning - A

Laboratory Manual, 3ª Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, 2001), e Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Como será apreciado pelos especialistas na técnica, a geração de sequências exatas para uma biblioteca compreendendo um grande número de sequências é potencialmente cara e demorada. Por "biblioteca" aqui entende-se um conjunto de variantes em qualquer forma, incluindo mas não limitado a uma lista de ácidos nucleicos ou sequências de aminoácidos, uma lista de ácidos nucleicos ou substituições de aminoácidos nas posições variáveis, uma biblioteca física compreendendo ácidos nucleicos que codificam as sequências de biblioteca, ou uma biblioteca física compreendendo as proteínas variantes, na forma purificada ou não purificada. Consequentemente, há uma diversidade de técnicas que podem ser usadas para gerar bibliotecas eficientemente. Esses métodos que podem encontrar uso são descritos ou referenciados nas US 6,403,312; US 2002/0048772; US 2002/0090648; US 2003/0130827; PCT WO 01/40091; e PCT WO 02/25588. Tais métodos incluem mas não são limitados a métodos de montagem de genes, métodos com base em PCR e métodos que usam variações de PCR, métodos baseados em reação em cadeia da ligase, métodos de oligos agrupados tais como os usados em embaralhamento sintético, métodos de amplificação propensos a erros e métodos que usam oligos com mutações aleatórias, métodos clássicos de mutagênese dirigida a sítio, mutagênese de cassete, e outra amplificação e métodos de síntese de genes. Como é conhecido na técnica, há uma variedade de kits disponíveis comercialmente e métodos para montagem de genes, mutagênese, subclonagem de vetor, e afins, e esses produtos comerciais encontram utilidade na presente invenção para gerar ácidos nucleicos que codificam anticorpos.

Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos por cultura de células hospedeiras transformadas com ácido nucleico, preferencialmente um vetor de expressão, contendo ácido nucleico que codifica os anticorpos, sob condições apropriadas para induzir ou causar a expressão da proteína. As condições apropriadas para a expressão irão variar com a escolha do vetor de expressão e a célula hospedeira, e serão facilmente verificadas por um especialista na técnica através de experiências de rotina. Uma grande variedade de células hospedeiras apropriadas pode ser usada, incluindo mas não limitadas a células de mamífero, bactérias, células de inseto, e leveduras. Por exemplo, várias linhas de células que podem ser úteis na presente invenção são descritas no catálogo de linhas de células ATCC®, disponíveis na American Type Culture Collection.

Os anticorpos podem ser expressos em sistemas de expressão em mamíferos, incluindo sistemas nos quais as construções de expressão são introduzidas nas células de mamífero usando vírus tais como retrovírus ou adenovírus. Podem ser usadas quaisquer células de mamífero, com as células humanas, de ratinho, rato, hamster, e de primata sendo particularmente preferidas. As células adequadas incluem também células de investigação conhecidas, incluindo mas não limitado a células T Jurkat, NIH3T3, OHC, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células NSO e variantes destas. As bibliotecas de proteínas podem ser expressas nas células bacterianas. Os sistemas de expressão bacterianos são conhecidos na técnica, e incluem *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, e *Streptococcus lividans*. Os anticorpos podem ser produzidos em células de inseto (por exemplo Sf21/Sf9, *Trichoplusia ni* Bti-Tn5b1-4) ou células de levedura (por exemplo *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc). Os anticorpos podem ser expressos *in vitro* usando sistemas de translação isentos de células.

Os sistemas de translação *in vitro* derivados tanto de células procarióticas (por exemplo *E. coli*) como de células eucarióticas (por exemplo gérmen de trigo, reticulócitos de coelho) estão disponíveis e podem ser escolhidas com base nos níveis de expressão e propriedades funcionais da proteína de interesse. Por exemplo, como apreciado pelos especialistas na técnica, a translação *in vitro* é requerida para algumas tecnologias de exibição, por exemplo exibição em ribossomas. Além disso, os anticorpos podem ser produzidos por métodos de síntese química. Também os sistemas de expressão transgênicos tanto animais (por exemplo vacas, ovelhas ou leite de cabra, ovos de galinha embrionados, larvas completas de inseto, etc.) e vegetal (por exemplo milho, tabaco, lentilha, etc.)

Os ácidos nucleicos que codificam a sequência de cadeia pesada e a sequência de cadeia leve dos anticorpos da presente invenção, como definido nas reivindicações, podem ser incorporados no vetor de expressão com vista a expressar a proteína. Uma diversidade de vetores de expressão podem ser utilizados para a expressão de proteína. Os vetores de expressão podem compreender vetores extra cromossomais auto replicantes ou vetores que se integram num genoma hospedeiro. Os vetores de expressão são construídos para serem compatíveis com o tipo de célula hospedeira. Assim, os vetores de expressão que encontram uso na presente invenção incluem mas não são limitados aos que viabilizam a expressão de proteína em células de mamífero, bactérias, células de inseto, leveduras, e em sistemas *in vitro*. Tal como é conhecido na técnica, uma diversidade de vetores de expressão estão disponíveis, comercialmente ou de outro modo, os quais podem encontrar uso na presente invenção para expressarem anticorpos.

Os vetores de expressão tipicamente compreendem uma proteína operacionalmente ligada com sequências de controle ou reguladoras, marcadores selecionáveis, quaisquer parceiros de fusão, e/ou elementos adicionais. Por "operacionalmente ligado" aqui entende-se que o ácido nucleico é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Geralmente, estes vetores de expressão incluem ácido nucleico regulador transcricional e translacional operacionalmente ligado ao ácido nucleico que codifica o anticorpo, e são tipicamente apropriados para a célula hospedeira usada para expressar a proteína. Em geral, as sequências reguladoras transcricionais e translacionais podem incluir sequências promotoras, sítios de ligação ribossomais, sequências transcricionais de início e paragem, sequências translacionais de início e paragem, e sequências melhoradoras ou ativadoras. Tal como é conhecido na técnica, os vetores de expressão tipicamente contêm um gene de seleção ou marcador para permitir a seleção das células hospedeiras transformadas contendo o vetor de expressão. Os genes de seleção são bem conhecidos na técnica e irão variar com a célula hospedeira usada.

Os anticorpos podem ser operacionalmente ligados a um parceiro de fusão para poderem atingir a proteína expressa, purificação, triagem, exibição, e afins. Os parceiros de fusão podem estar ligados à sequência de anticorpo através de sequências de ligantes. A sequência ligante compreende geralmente um pequeno número de aminoácidos, tipicamente menos que dez, embora ligantes mais longos possam ser usados. Tipicamente, as sequências ligantes são selecionadas para serem flexíveis e resistentes à degradação. Tal como será avaliado pelos especialistas na técnica, qualquer de uma vasta variedade de sequências pode ser usada como ligante. Por exemplo, uma sequência ligante comum compreende a sequência de aminoácidos GGGGS. Um

parceiro de fusão pode ser uma sequência alvo ou de sinalização que direciona o anticorpo e quaisquer parceiros de fusão associados para a desejada localização celular ou para meios extracelulares. Como é conhecido na técnica, certas sequências de sinalização podem visar uma proteína a ser secretadas para o meio de crescimento, ou para o espaço periplasmático, localizado entre a membrana interna e a externa da célula. Um parceiro de fusão pode ser também uma sequência que codifica um péptido ou proteína que viabiliza a purificação e/ou triagem. Tais parceiros de fusão incluem mas não são limitados a etiquetas de polihistidina (His-etiquetas) (por exemplo H6 e H10 ou outras etiquetas para uso com sistemas Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado (CAMI) (por exemplo colunas de afinidade Ni^{+2})), fusões GST, fusões MBP, Strep-tag, a sequência alvo de biotinylation BSP da enzima bacteriana BirA, e etiquetas epitopo que são visadas por anticorpos (por exemplo etiquetas c-myc, etiquetas bandeira, e afins). Tal como será avaliado pelos especialistas na técnica, essas etiquetas podem ser úteis para purificação, para triagem, ou ambas. Por exemplo, um anticorpo pode ser purificado usando uma etiqueta His imobilizando-o numa coluna de afinidade Ni^{+2} , e depois após purificação a mesma etiqueta His pode ser usada para imobilizar o anticorpo numa placa revestida a Ni^{+2} para realizar um ELISA ou outro ensaio de ligação (como descrito abaixo). Um parceiro de fusão pode viabilizar o uso de um método de seleção para testar anticorpos (ver abaixo). Os parceiros de fusão que viabilizam uma diversidade de métodos de seleção são bem conhecidos na técnica, e todos estes encontram uso na presente invenção. Por exemplo, fundindo os membros de uma biblioteca de anticorpo ao gene da proteína III, a apresentação de fagos pode ser utilizada (Kay et al., *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman et al., 1991,

Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:13315-1317). Os parceiros de fusão podem viabilizar anticorpos a serem marcados. Em alternativa, um parceiro de fusão pode ligar-se a uma sequência específica no vetor de expressão, permitindo que o parceiro de fusão e anticorpo associado seja ligado covalentemente ou não covalentemente com o ácido nucleico que os codifica.

Os métodos de introdução de ácido nucleico exógeno nas células hospedeiras são bem conhecidos na técnica, e vão variar com a célula hospedeira usada. As técnicas incluem mas não são limitadas a transfeção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, tratamento de cloreto de cálcio, transfeção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, eletroporação, infecção viral ou de fago, encapsulação dos polinucleótido(s) em liposomas, e microinjeção direta de DNA nos núcleos. No caso de células de mamífero, a transfeção pode ser transiente ou estável. Os anticorpos podem ser purificados ou isolados após expressão. As proteínas podem ser isoladas ou purificadas numa diversidade de vias conhecidas dos especialistas na técnica. Métodos de purificação padrão incluem técnicas cromatográficas, incluindo troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade, calibração ou filtração em gel, e fase reversa, realizados à pressão atmosférica ou a alta pressão usando sistemas tais como FPLC e HPLC. Os métodos de purificação incluem também técnicas eletroforéticas, imunológicas, de precipitação, de diálise, e cromatofocussação. Técnicas de ultrafiltração e diafiltração, em conjunção com concentração de proteína, são também úteis. Como é bem conhecido na técnica, uma diversidade de proteínas naturais liga Fc e anticorpos, e estas proteínas podem encontrar utilização na presente invenção para purificação de anticorpos. Por exemplo, as proteínas bacterianas A e G ligam-se à região Fc. Do mesmo

modo, a proteína bacteriana L liga-se à região Fab de alguns anticorpos, como evidentemente faz o antigénio alvo do anticorpo. A purificação pode, muitas vezes, ser viabilizada por um parceiro de fusão particular. Por exemplo, os anticorpos podem ser purificados usando resina de glutathione se for empregue fusão GST, cromatografia de afinidade Ni^{+2} se é empregue uma etiqueta His, ou se é usado anticorpo anti-bandeira imobilizado. Para orientação geral em técnicas de purificação adequadas, ver, por exemplo Protein Purification: Principles and Practice, 3ª Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. O grau de purificação necessário variará dependendo da triagem ou da utilização dos anticorpos. Em alguns casos não é necessária purificação. Por exemplo numa forma de realização, se os anticorpos são secretados, a triagem pode ser feita diretamente a partir dos meios. Como é bem conhecido na técnica, alguns métodos de seleção não envolvem a purificação das proteínas. Assim, por exemplo, se uma biblioteca de anticorpos é feita numa biblioteca de apresentação de fagos, a purificação da proteína pode não ser realizada.

Experimentação *in vitro*

Os anticorpos podem ser triados usando uma diversidade de métodos, incluindo mas não limitado aos que usam ensaios *in vitro*, ensaios *in vivo* à base de células, e seleção de tecnologias. Automação e tecnologias de rastreio de alto rendimento podem ser utilizadas nos procedimentos de triagem. A triagem pode empregar o uso de um parceiro de fusão ou marcador. O uso de parceiros de fusão foi discutido acima. Por "marcado" aqui entende-se que os anticorpos da invenção pode ter um ou mais elementos, isótopos, ou compostos químicos anexados para permitir a deteção de uma triagem. Em geral, os marcadores inserem-se

em três classes: a) marcadores imunológicos, os quais podem ser um epítopo incorporado como um parceiro de fusão que é reconhecido por um anticorpo, b) marcadores isotópicos, os quais podem ser radioativos ou isótopos pesados, e c) pequenas moléculas marcadoras, as quais podem incluir corantes fluorescentes e colorimétricos, ou moléculas tais como biotina que permite outros métodos de marcação. Os marcadores podem ser incorporados no composto em qualquer posição e podem ser incorporados *in vitro* ou *in vivo* durante a expressão de proteína.

As propriedades funcionais e/ou biofísicas de anticorpos são triados num ensaio *in vitro*. Os ensaios *in vitro* podem permitir uma ampla gama dinâmica para propriedades de triagem de interesse. As propriedades dos anticorpos que podem ser triados incluem mas não são limitados a estabilidade, solubilidade, e afinidade para os ligandos Fc, por exemplo FcγRs. Podem ser triadas múltiplas propriedades simultaneamente ou individualmente. As proteínas podem ser purificadas ou não purificadas, dependendo dos requisitos do ensaio. A triagem é um ensaio de ligação qualitativo ou quantitativo para ligar anticorpos a uma proteína ou molécula não proteína que se conhece ou se pensa ligar o anticorpo. A triagem é um ensaio de ligação para medir a ligação ao antígeno alvo. A triagem é um ensaio para ligação dos anticorpos a um ligando Fc, incluindo mas não limitados à família dos FcγRs, o recetor FcRn neonatal, a proteína complemento C1q, e as proteínas bacterianas A e G. Os referidos ligandos Fc podem ser de qualquer organismo, com os humanos, de ratinho, ratos, coelho, e macacos sendo preferidos. Podem ser realizados ensaios usando uma diversidade de métodos conhecidos na técnica, incluindo mas não limitado a ensaios com base em FRET (Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência) e BRET (Transferência de Energia de

Ressonância de Bioluminescência), AlphaScreen™ (Ensaio de Proximidade Luminescente homogênea amplificada), Ensaio de Proximidade de Cintilação, ELISA (Ensaio Imunosorbente Ligado a Enzima), SPR (Ressonância plasmônica de superfície, também conhecida como Biacore™), calorimetria de titulação isotérmica, calorimetria diferencial exploratória, eletroforese em gel, e cromatografia incluindo filtração em gel. Estes e outros métodos podem assumir a vantagem de algum parceiro de fusão ou marcador do anticorpo. Ensaio podem empregar uma diversidade de métodos de detecção incluindo mas não limitado a cromogénicos, fluorescentes, luminescentes, ou marcadores isotópicos.

As propriedades biofísicas de anticorpos, por exemplo estabilidade e solubilidade, podem ser triadas usando uma diversidade de métodos conhecidos na técnica. A estabilidade de proteína pode ser determinada medindo o equilíbrio termodinâmico entre estados dobrados e não dobrados. Por exemplo, os anticorpos da presente invenção podem ser não dobrados usando desnaturante químico, calor, ou pH, e esta transição pode ser monitorizada usando métodos incluindo mas não limitado a espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de absorção, espectroscopia de NMR, calorimetria, e proteólise. Tal como será avaliado pelos especialistas na técnica, os parâmetros cinéticos das transições de dobragem e não dobragem podem também ser monitorizados usando estas e outras técnicas. A solubilidade e integridade estrutural global de um anticorpo podem ser determinadas quantitativamente ou qualitativamente usando um vasta gama de métodos que são conhecidos na técnica. Métodos que podem encontrar uso na presente invenção para caracterizar as propriedades biofísicas de anticorpos incluem eletroforese em gel,

focagem isoelétrica, eletroforese capilar, cromatografia tal como cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de troca iônica, e cromatografia líquida de alta resolução de fase reversa, mapeamento peptídico, mapeamento de oligossacárido, espectrometria de massa, espectroscopia de absorção ultravioleta, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica, calorimetria diferencial exploratória, ultra-centrifugação analítica, dispersão de luz dinâmica, proteólise, e ligação cruzada, medição de turbidez, ensaios de retardamento de filtro, ensaios imunológicos, ensaios de ligação de corantes fluorescentes, ensaios de coloração de proteína, microscopia, e detecção de agregados via ELISA ou outro ensaio de ligação. As análises estruturais empregam técnicas de cristalografia de raio X e espectroscopia de NMR pode também encontrar utilização. A estabilidade e/ou a solubilidade podem ser medida determinando a quantidade de solução de proteína após algum período de tempo definido. Neste ensaio, a proteína pode ser ou não ser exposta a algumas condições extremas, por exemplo temperatura elevada, pH baixo, ou presença de desnaturante. Porque a função tipicamente requer uma proteína estável, solúvel, e/ou bem dobrada/estruturada, os ensaios funcionais e de ligação acima mencionados fornecem também modos para realizar uma tal medida. Por exemplo, uma solução compreendendo um anticorpo pode ser ensaiada quanto à sua capacidade para ligar o antígeno alvo, depois exposta a elevada temperatura por um ou mais períodos de tempo definidos, depois ensaiada novamente quanto à ligação antígeno. Porque a proteína agregada e não dobrada não é esperado que seja capaz de ligar antígeno, a quantidade de atividade restante fornece uma medida da estabilidade e solubilidade do anticorpo.

A biblioteca é triada usando um ou mais ensaios com base celular ou *in vitro*. Para esses ensaios, anticorpos, purificados ou não purificados, são tipicamente adicionados exogenamente de modo a que as células sejam expostas a variantes individuais ou grupos de variantes pertencendo à biblioteca. Estes ensaios são tipicamente, mas não sempre, com base na biologia da capacidade do anticorpo para ligar a antígeno e mediar algum evento bioquímico, por exemplo funções efetoras como lise celular, fagocitose, inibição de ligação ligando/recetor, inibição do crescimento e/ou proliferação, apoptose e afins. Esses ensaios frequentemente envolvem a monitorização da resposta das células ao anticorpo, por exemplo sobrevivência celular, morte celular, fagocitose celular, lise celular, alteração na morfologia celular, ou ativação transcricional tal como expressão celular de um gene natural ou gene repórter. Por exemplo, esses ensaios podem medir a capacidade dos anticorpos para elicitar CMCA, FCDA, ou CDC. Para alguns ensaios células adicionais ou componentes, ou seja para além das células alvo, pode ter que ser adicionadas, por exemplo complemento sérico, ou células efetoras tais como monócitos do sangue periférico (CMSPs), células NK, macrófagos, e afins. Essas células adicionais podem ser de qualquer organismo, preferencialmente humanos, ratinhos, ratos, coelhos, e macaco. Anticorpos reticulados ou monoméricos podem causar apoptose de certas linhas de células expressando o antígeno alvo do anticorpo, ou podem mediar o ataque nas células alvo por células imunitárias as quais foram adicionadas ao ensaio. Métodos para monitorizar a morte celular ou a viabilidade são conhecidos na técnica, e incluem o uso de corantes, fluoróforos, imunquímicos, citoquímicos, e reagentes radioativos. Por exemplo, ensaios de caspase ou flouoroconjugados anexina podem viabilizar a apoptose a ser medida, e absorção ou liberação de substratos radioativos (por exemplo ensaio de libertação

Crómio-51) ou a redução metabólica de corantes fluorescentes tais como azul alamar pode permitir o crescimento celular, ativação da proliferação ou ativação a ser monitorizada. É usado o ensaio de citotoxicidade com base em EuTDA DELFIA® (Perkin Elmer, MA). Em alternativa, células alvo mortas ou danificadas podem ser monitorizadas medindo a libertação de uma ou mais proteínas intracelulares naturais, por exemplo lactato desidrogenase. A ativação transcricional pode também servir como um método para ensaiar a função em ensaios com base celular. Neste caso, a resposta pode ser monitorizada ensaiando os genes ou proteínas naturais que podem ser regulados para cima ou regulados para baixo, por exemplo a libertação de certas interleucinas pode ser medida, ou em alternativa a leitura pode ser através de luciferase ou construção de repórter GFP. Ensaio à base de células podem também envolver as mudanças de mudanças morfológicas de células como resposta à presença de um anticorpo. Tipos de células para tais ensaios podem ser procarióticas ou eucarióticas, e pode ser empregue uma diversidade de linhas de células que são conhecidas na técnica. Em alternativa, triagens com base celular são realizadas usando células que foram transformadas ou transfectadas com ácidos nucleicos que codificam os anticorpos.

Os ensaios *in vitro* incluem mas não são limitados a ensaios de ligação, CMCA, CDC, fagocitose, citotoxicidade, proliferação, apoptose, necrose, paragem do ciclo celular, libertação peróxido/ozono, quimiotaxia de células efetoras, inibição desses ensaios por redução da função efetora dos anticorpos; intervalos de atividades como >100x melhoramento ou >100x redução, misturas de ativação do recetor e os resultados do ensaio que são esperados desses perfis de recetor.

Experimentação *in vivo*

As propriedades biológicas dos anticorpos da presente invenção podem ser caracterizadas na célula, tecido, e experiência de organismo completo. Como é conhecido na técnica, os fármacos são muitas vezes testados em animais, incluindo mas não limitado a ratinho, ratos, coelhos, cães, gatos, porcos, e macacos, com vista a medir a eficácia do fármaco para tratamento contra uma doença ou modelo de doença, ou medir as farmacocinéticas, toxicidade, e outras propriedades do fármaco. Os referidos animais podem ser referidos como modelos de doença. Em relação aos anticorpos da presente invenção, surge um desafio particular quando se usam modelos animais para avaliar o potencial para eficácia em humano de polipéptidos candidatos- isto é devido, pelo menos em parte, ao facto dos anticorpos que tem um efeito específico sobre a afinidade para um recetor humano Fc podem não ter um efeito de afinidade semelhante ao recetor de animais ortólogos. Estes problemas podem ser agravados pelas ambiguidades inevitáveis associadas com a atribuição correta de ortólogos verdadeiros (Mechetina et al., Immunogenetics, 2002 54:463-468), e o facto que alguns ortólogos simplesmente não existem no animal (por exemplo os humanos possuem um FcγRIIa enquanto que o ratinho não). As terapêuticas são frequentemente testadas em ratinho, incluindo mas não limitado a ratinho nú, ratinho SCID, ratinho xeno enxertado, e ratinho transgénico (incluindo noquins e nocautes). Por exemplo, um anticorpo da presente invenção que se destina a uma terapêutica antineoplásica, pode ser testada num modelo de cancro e ratinho, por exemplo um ratinho xeno enxertado. Neste método, um tumor ou linha de células tumoral é enxertado em ou injetado num ratinho, e subsequentemente o ratinho é tratado com a terapêutica para determinar a capacidade do anticorpo para reduzir ou inibir o crescimento tumoral e as metástases.

Uma abordagem alternativa é o uso de um modelo de murino SCID no qual os ratinhos imunodeficientes são injetados com Linfócitos do Sangue Periférico (PBLs) humanos, conferindo um sistema imunitário semifuncional e humano - com uma matriz apropriada de FcRs humanos - ao ratinho que foi subsequentemente injetado com anticorpos ou polipéptidos Fc que visa as células tumorais humanas injetadas. Num tal modelo, os polipéptidos Fc que visam o desejado antígeno (tal como her2/neu em células cancerígenas de ovário SkOV3) interagem com PBLs humanos dentro do ratinho para envolver funções efetoras tumoricidas. Tal experimentação pode fornecer dados significativos para determinação do potencial do referido anticorpo a ser usado como uma terapêutica. Quaisquer organismos, preferencialmente mamíferos, podem ser usados para teste. Por exemplo devido à sua semelhança genética com os humanos, os macacos podem ser modelos terapêuticos adequados, e portanto podem ser usados para testar a eficácia, toxicidade, farmacocinéticas, ou outras propriedades dos anticorpos da presente invenção. Os testes de anticorpos da presente invenção em humanos são, em última análise, necessários para aprovação dos medicamentos, e, assim, obviamente estas experiências estão contempladas. Portanto os anticorpos da presente invenção podem ser testados em humanos para determinar a sua eficácia terapêutica, toxicidade, farmacocinéticas, e/ou outras propriedades clínicas.

Os anticorpos da presente invenção podem conferir desempenho superior nas terapêuticas contendo Fc em modelos animais ou em humanos. Os perfis de ligação ao recetor desses anticorpos, como descrito nesta especificação, podem, por exemplo, ser selecionados para aumentar a potência de fármacos citotóxicos ou para visar funções efetoras ou células efetoras específicas para melhorar a seletividade da ação dos fármacos. Mais ainda, perfis de

ligação a recetor podem ser seleccionados que podem reduzir algumas ou todas as funções efetoras reduzindo assim os efeitos secundários ou a toxicidade do tal fármaco contendo Fc. Por exemplo, um anticorpo com ligação reduzida a FcγRIIIa, FcγRI e FcγRIIa pode ser seleccionado para eliminar a maioria da função efetora mediada por célula, ou um anticorpo com reduzida ligação a C1q pode ser seleccionado para limitar as funções efetoras mediadas por complemento. Em alguns contextos, tais funções efetoras são conhecidas terem potenciais efeitos tóxicos, portanto eliminando-os pode aumentar a segurança do fármaco carregando Fc e essa segurança aumentada pode ser caracterizada em modelos animais. Em certos contextos, essas funções efetoras são conhecidas por mediar a desejada atividade terapêutica, assim aumentando-a podem aumentar a atividade ou a potência do fármaco carregando Fc e essa atividade ou potência melhorada pode ser caracterizada em modelos animais.

Os anticorpos otimizados podem ser testados numa diversidade de modelos tumorais ortotópicos. Estes modelos animais clinicamente relevantes são importantes no estudo de patofisiologia e terapia de cancros agressivos como o cancro pancreático, da próstata e da mama. Ratinhos privados de imunidade incluindo, mas não limitado a ratinhos nus atímicos ou SCID são frequentemente usados na classificação de disseminação do tumor local e sistémica do local de injeção intraórgão (por exemplo pâncreas, próstata ou glândula mamária) de células tumorais humanas ou fragmentos de doentes dadores.

Os anticorpos da presente invenção podem ser avaliados quanto à eficácia em modelos animais clinicamente relevantes de várias doenças humanas. Em muitos casos,

modelos relevantes incluem vários animais transgênicos para antígenos específicos de tumores.

Modelos transgênicos relevantes tais como aqueles que expressam recetores Fc humanos (por exemplo, CD16 incluindo a cadeia gama, FcγR1, RIIa/b, e outros) devem ser usados para avaliar os anticorpos de teste e fusões Fc quanto à sua eficácia. A avaliação dos anticorpos por introdução de genes humanos que medeiam a função efetora direta ou indiretamente em ratinho ou outros roedores que podem viabilizar estudos fisiológicos de eficácia na toxicidade tumoral ou outras doenças tais como distúrbios auto-imunes e RA. Os recetores Fc humanos tais como FcγRIIIa podem possuir polimorfismos como os da posição 158 V ou F que podem viabilizar ainda mais a introdução de específicos e combinações polimorfismos humanos nos roedores. Os vários estudos envolvendo FcRs específicos de polimorfismo não são, no entanto, limitados a esta secção e englobam todas as discussões e aplicações de FcRs em geral como especificado ao longo destes anticorpos de aplicação da presente invenção pode conferir atividade superior em fármacos contendo Fc nesses modelos transgênicos, em variantes específicas com perfis de ligação otimizado para atividade mediada por FcγRIIIa humana pode mostrar atividade superior em ratinhos CD 16 transgênicos. Melhorias similares da eficácia, em ratinhos transgênicos para os outros recetores Fc humanos, por exemplo FcγRIIa, FcγRI, etc., podem ser observadas para os anticorpos com os perfis de ligação otimizados para os recetores respetivos. Ratinhos transgênicos para múltiplos recetores humanos deveriam mostrar atividade melhorada para anticorpos com perfis de ligação otimizados para os correspondentes recetores múltiplos, por exemplo como mostrado na Figura 5.

Devido às dificuldades e ambiguidades associadas com o uso de modelos animais para caracterizar a eficácia potencial dos anticorpos terapêuticos candidatos num doente humano, alguns polipéptidos variantes da presente invenção podem encontrar utilidade como procuradores para avaliar a eficácia potencial em humanos. Tais moléculas procuradoras devem preferencialmente mimetizar - no sistema animal - a biologia FcR e/ou de complemento do correspondente anticorpo humano candidato. Este mimetismo é mais provável que seja manifestado pelas afinidades de associação relativas entre anticorpos e animais específicos vs. recetores humanos. Por exemplo, se se está a usar um modelo de ratinho para avaliar a potencial eficácia em humanos de um anticorpo que tem afinidade aumentada para FcγRIIIa humano, uma variante de procuração apropriada deverá ter afinidade aumentada para FcγRIII-2 de ratinho (CD16-2 de ratinho). Em alternativa se se está a usar um modelo de ratinho para avaliar a potencial eficácia em humano de um anticorpo que tem afinidade reduzida para o FcγRIIb inibitório humano, uma variante de procuração apropriada deverão ter afinidade reduzida para FcγRII de ratinho. Também deve ser notado que os anticorpos procuradores podem ser criados no contexto de um anticorpo humano, um anticorpo animal, ou ambos.

Os testes de anticorpos podem incluir estudos de eficácia em primatas (por exemplo modelo de macaco cinomólogo) para facilitar a avaliação da depleção de células alvo específicas abrigando o antígeno alvo. Outros modelos de primatas incluem mas não são limitados aos de macacos rhesus e polipéptidos Fc em estudos terapêuticos de auto-imune, transplante e cancro.

São realizados estudos de toxicidade para determinar os efeitos relacionados de anticorpo ou fusão Fc que não podem

ser avaliados em perfis de farmacologia padrão ou ocorrem somente após administração repetida do agente. A maioria dos testes de toxicidade são realizados em duas espécies - um roedor e um não roedor - para assegurar que quaisquer efeitos adversos não esperados não são desprezados antes que novas entidades terapêuticas sejam introduzidas no homem. Em geral, estes modelos podem medir uma diversidade de toxicidades incluindo genotoxicidade, toxicidade crônica, imunogenicidade, toxicidade reprodutiva/de desenvolvimento e carcinogenicidade. Incluídos nos parâmetros acima mencionados estão medidas padrão de consumo de alimentos, peso corporal, formação de anticorpo, química clínica, e exame macro e microscópico de órgãos/tecidos padrão (por exemplo cardiotoxicidade). Outros parâmetros de medição são o traumatismo no local de injeção e a medição dos anticorpos neutralizantes, se algum. Tradicionalmente, as terapêuticas de anticorpo monoclonais, nuas ou conjugadas são avaliadas quanto à reatividade cruzada com os tecidos normais, produção de imunogenicidade/anticorpo, toxicidade de conjugado ou ligante e toxicidade "bystander" de espécies radiomarcadas. No entanto, tais estudos podem ter de ser individualizados para responder às preocupações específicas e seguindo o conjunto de orientações por ICH S6 (Estudos de segurança para produtos biotecnológicos, também mencionado anteriormente). Como tal, os princípios gerais dos produtos são suficientemente bem caracterizados e relativamente aos quais impurezas/contaminantes foram removidos, que o material de teste é comparável ao longo do desenvolvimento, e cumprimento das GLP.

As farmacocinéticas (PK) dos anticorpos da invenção podem ser estudadas numa diversidade de sistemas animais, com o mais relevante sendo o de primatas não humanos tais como os cinomolgos, macacos rhesus. Administrações i.v./s.c. únicas

ou repetidas de mais de uma gama de dosagem de 6000-vezes (0,05-300 mg/kg) podem ser avaliadas sobre a meia vida (dias a semanas) usando concentração plasmática e depuração assim como pode ser medido o volume de distribuição a um estado de equilíbrio e nível de absorbância sistêmica. Exemplos desses parâmetros de medida incluem geralmente a concentração plasmática máxima observada (C_{max}), o tempo para atingir C_{max} (T_{max}), e a área sob a curva de concentração plasmática-tempo de tempo de 0 até ao infinito [$AUC(0-inf)$] e eliminação da semivida aparente ($T_{1/2}$). Outros parâmetros medidos pode incluir análise comportamental dos dados de concentração-tempo obtidos a seguir à administração e biodisponibilidade de i.v.. Exemplos de estudos farmacológicos/toxicológicos usando cinomologos foram estabelecidos para Rituxan e Zevalina em que os anticorpos monoclonais para CD20 são de reação cruzada. A biodistribuição, dosimetria (para anticorpos radiomarcados), e estudos de PK podem também ser feitos em modelos de roedores. Esses estudos de avaliação da tolerância em todas as doses administradas, toxicidade para os tecidos localizados, localização preferencial para modelos animais de roedores xenoenxertados, depleção de células alvo (por exemplo células CD20 positivas).

Os anticorpos da presente invenção podem conferir farmacocinéticas superiores nas terapêuticas contendo Fc em sistemas animais ou em humanos. Por exemplo, a ligação aumentada a FcRn pode aumentar a meia vida e a exposição ao fármaco contendo Fc. Em alternativa, a ligação diminuída a FcRn pode diminuir a meia vida e a exposição ao fármaco contendo Fc nos casos em que a exposição reduzida é favorável tal como quando esse fármaco tem efeitos secundários.

É conhecido na técnica que o conjunto de recetores Fc é expresso diferencialmente em vários tipos de células imunitárias, assim como em diferentes tecidos. Distribuição diferencial nos tecidos de recetores Fc pode em última análise ter um impacto nas propriedades farmacodinâmicas (PD) e farmacocinéticas (PK) de anticorpos da presente invenção. Porque os anticorpos da apresentação têm afinidades variáveis com o conjunto de recetores Fc, um rastreio suplementar dos polipéptidos quanto às propriedades de PD e/ou PK pode ser extremamente útil para definir o equilíbrio ótimo de PD, PK, e a eficácia terapêutica conferida por cada polipéptido candidate.

Estudos de farmacodinâmica podem incluir, mas não são limitados a, visar células tumorais específicas ou bloquear os mecanismos de sinalização, medir a depleção do antigénio alvo expressando células ou sinais, etc. Os anticorpos da presente invenção podem visar populações de células efectoras específicas e deste modo direccionar fármacos contendo Fc para recrutar certas atividades para melhorar a potência ou para aumentar a penetração num compartimento fisiológico particularmente favorável. Por exemplo, a atividade de neutrófilos e localização podem ser visados por um anticorpo que preferencialmente visa FcγRIIIb. Tais efeitos farmacodinâmicos podem ser demonstrados em modelos animais ou em humanos.

Uso clínico

Os anticorpos da presente invenção podem ser usados para vários fins terapêuticos como definido nas reivindicações. Tal como será apreciado por aqueles na técnica, os anticorpos da presente invenção podem ser usados para quaisquer fins terapêuticos que usem anticorpos e os afins. Numa forma de realização preferida, os anticorpos podem ser

administrados a um doente para tratar doenças incluindo mas não limitadas a cancro, doenças autoimunes e inflamatórias, e doenças infecciosas.

Um "doente" para os fins da presente invenção inclui tanto humanos como outros animais, preferencialmente mamíferos e mais preferencialmente humanos. Portanto os anticorpos da presente invenção têm aplicações nas terapias humanas e veterinária. O termo "tratamento," ou "tratar" no contexto da presente invenção entende-se para incluir o tratamento terapêutico, assim como profilático, ou medidas de supressão de uma doença ou distúrbio. Assim, por exemplo, a administração bem sucedida de um anticorpo antes do início da doença resulta no tratamento da doença. Como outro exemplo, a administração bem sucedida de um anticorpo otimizado após manifestação clínica da doença para combater os sintomas da doença compreende o tratamento da doença. "Tratamento" e "tratar" incluem também a administração de um anticorpo otimizado após o aparecimento da doença com vista a erradicar a doença. A administração bem sucedida de um agente após o início e após os sintomas clínicos serem desenvolvidos, com possível redução dos sintomas clínicos e talvez a melhoria da doença, compreende o tratamento da doença. Aqueles "com necessidade de tratamento" incluem mamíferos já com a doença ou distúrbio, assim como aqueles com tendência para ter a doença ou distúrbio, incluindo aqueles em que a doença ou distúrbio é para ser prevenido.

Um anticorpo da presente invenção pode ser administrado a um doente com uma doença envolvendo expressão inapropriada de uma proteína ou outra molécula. Isto significa a inclusão de doenças e distúrbios caracterizados por proteínas aberrantes, devido por exemplo a alterações na quantidade da proteína presente, da localização da proteína, da modificação postranslacional, do estado

conformacional, a da presença de um mutante ou proteína do patógeno, etc. De modo semelhante, a doença ou distúrbio pode ser caracterizado pelas moléculas de alterações incluindo mas não limitado a polissacáridos e gangliósidos. Uma superabundância pode ser devida a qualquer causa, incluindo mas não limitado a sobre expressão a nível molecular, aparecimento prolongado ou acumulado no sítio de ação, ou atividade aumentada da proteína em relação ao normal. Incluídos nesta definição estão doenças e distúrbios caracterizados por uma redução da proteína. Esta redução pode ser devida a qualquer causa, incluindo mas não limitado a expressão reduzida a nível molecular, aparecimento encurtado ou reduzido no sítio de ação, formas mutantes da proteína, ou atividade reduzida da proteína em relação ao normal. Uma tal superabundância ou redução da proteína pode ser medida em relação à expressão normal, aparecimento, ou atividade da proteína, e a medida referida pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento e/ou testagem clínica dos anticorpos da presente invenção.

Por "cancro" e "canceroso" aqui refere-se a ou descreve a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de cancro incluem mas não são limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluindo lipossarcoma), tumores neuroendócrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma, e leucemia ou malignidades linfóides.

Exemplos mais específicos de tais cancros incluem malignidades hematológicas, tais como linfomas não Hodgkin (LNH). Os cancros LNH incluem mas não são limitados a Linfoma de Burkitt (LB), linfoma linfocítico de pequenas células/leucemia linfocítica crónica (SLL/LLC), linfoma de células do manto (LCM), linfoma folicular (LF), linfoma da

células B grande difusa (LCGD), linfoma de zona marginal (LZM), leucemia células pilosas (LCP) e leucemia linfocítica (LPL), linfoma das células B da zona marginal extranodal do tecido linfóide associado a mucosa (MALT), linfoma das células B da zona marginal nodal, linfoma de células grandes do mediastino, linfoma de células grande intravascular, linfoma de efusão primária, leucemia/linfoma linfoblástica de B precursoras, linfoma das células T e NK precursoras (linfoma linfoblástico de T precursora, linfoma blástico das células NK), tumores das células T e NK maduras, incluindo linfoma e leucemia da célula T periférica (PTL), leucemia da célula T adulta/ linfomas das célula T e leucemia linfocítica granular grande, leucemia linfocítica crónica da célula T/leucemia prolinfocítica, leucemia linfocítica granular da célula T grande, leucemia agressiva da célula NK, linfoma extranodal de células T-/NK, linfoma da célula T tipo enteropatia, linfoma hepatosplénico da célula T, linfoma anaplástico da célula grande (ALCL), linfoma angiocétrico e angioimunoblástico da célula T, micose fungóide/síndrome de Sézary, e linfoma cutâneo da célula T (CTCL). Outros cancros que podem ser tratados pelos anticorpos da invenção incluem mas não são limitados a Linfoma de Hodgkin, tumores de células precursoras de linfócitos, incluindo leucemia/linfoma linfoblástico aguda das células B (B-LLA), e leucemia/linfoma linfoblástica aguda da célula T (T-LLA), timoma, histiocitose celular de Langerhans, mieloma múltiplo, neoplasias mielóides tais como leucemias mielogénica aguda (AML), incluindo AML com maturação, AML sem diferenciação, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, e leucemias monocíticas agudas, síndromas mielodisplásticos, e doenças mieloproliferativa crónicas (MDS), incluindo leucemia mielogénica crónica (LMC). Outros cancros que podem ser tratáveis pelos anticorpos da invenção incluem mas não são limitados a

tumores do sistema nervoso central tais como glioma, glioblastoma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma, e retinoblastoma; tumores sólidos da cabeça e pescoço (por exemplo cancro nasofaríngeo, carcinoma das glândulas salivares, e cancro esofágico), pulmão (por exemplo cancro das pequenas células do pulmão, cancro não das pequenas células pulmão, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão), sistema digestivo (por exemplo cancro do estômago ou gástrico incluindo cancro gastrointestinal, cancro do duto biliar ou do trato biliar, cancro do colon, cancro retal, cancro colorectal, e carcinoma anal), sistema reprodutivo (por exemplo cancro testicular, penis, ou próstata, uterino, vaginal, vulvar, cervical, ovárico, e do endométrio), pele (por exemplo melanoma, carcinoma das células basal, cancro das células escamosas, queratose actínica), fígado (por exemplo cancro do fígado, carcinoma hepático, cancro hepatocelular, e hepatoma), ósseos (por exemplo osteoclastoma, e cancros ósseos osteolíticos), tecidos e órgãos adicionais (por exemplo cancro pancreático, cancro da bexiga, cancro do rim ou renal, cancro da tiróide, cancro da mama, cancro do peritoneu, e sarcoma de Kaposi), e tumores do sistema vascular (por exemplo angiosarcoma e hemangiopericitoma).

Indicações oncológicas preferidas que podem ser tratados pelos anticorpos anti-CD19 da invenção incluem mas não são limitadas a todos os linfomas não Hodgkin (LNH), especialmente LNH refratária/resistente, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda das células B/linfoma (B-LLA), e linfoma de células do manto (LCM).

Resultados da autoimunidade de uma quebra da auto-tolerância envolvendo mecanismos imunitários humorais e/ou mediados por células. Entre as consequências da falha na

tolerância central e/ou periférica, são a sobrevivência e ativação de células B e células T auto reativas. Várias doenças autoimunes são definidas por ativação excessiva dos linfócitos B e/ou T. A ativação destas células requerem em cooperação, o acoplamento de antígeno e sinais co-estimuladores dos linfócitos de interação. depleção mediada por anticorpo, inibição, anti-proliferação, e/ou bloqueamento das células B são abordagens terapêuticas para o tratamento de doença autoimune.

Por "doenças autoimunes" aqui incluem rejeição do enxerto alogénico em ilhota, alopecia areata, espondilite anquilosante, síndrome antifosfolipídico, doença autoimune de Addison, autoanticorpos antineutrófilos citoplasmáticos (ANCA), doenças autoimunes da glândula adrenal, anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimune, miocardite autoimune, neutropenia autoimune, ooforite autoimune e orquite, trombocitopenia autoimune, urticária auto-imune, doença de Behcet, penfigóide bolhoso, cardiomiopatias, Síndrome de Castleman, spruce-dermatite celíaca, síndrome disfunção imunológica de fadiga crónica, polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigóide cicatricial, síndrome de CREST, doença aglutinina fria, doença de Crohn, dermatomiosite, lúpus discóide, crioglobulinemia mista essencial, deficiência de fator VIII, fibroialgia-fibromiosite, glomerulonefrite, doença de Grave, Guillain-Barre, síndrome de Goodpasture, doença de enxerto-versus-hospedeiro (GVHD), tiroidite de Hashimoto, hemofilia A, fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénia idiopática (PTI), neuropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenia imunomediada, artrite juvenil, doença de Kawasaki, líquen plantus, lúpus eritematoso, doença de Meniere, doença mista do tecido conjuntivo, esclerose múltipla (MS), diabetes mellitus tipo 1, miastenia grave, pênfigo vulgar, anemia perniciosa,

poliarterite nodosa, policrondrite, síndromas poliglandular, polimialgia reumática, polimiosite e dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoríase, artrite psoriática, fenómeno de Reynauld, síndrome de Reiter, artrite reumatóide (RA), sarcoidose, escleroderma, síndrome de Sjogren, rejeição de transplante de órgão sólido, síndrome de pessoa rígida, sistema de lúpus eritematóide (SLE), arterite de Takayasu, arterite temporal/ arterite de células gigantes, púrpura trombocitopenia trombótica, colite ulcerosa, uveíte, vasculites tais como vasculite dermatite herpetiforme, vitiligo, e granulomatose de Wegener.

Indicações autoimunes que podem ser tratadas pelos anticorpos anti-CD19 da invenção incluem mas não são limitados a artrite reumatóide (RA), sistema de lúpus eritematóide (SLE ou lúpus), esclerose múltipla, Síndrome de Sjogren, e púrpura trombocitopénia idiopática (PTI).

Por "distúrbios inflamatórios" aqui incluem-se síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), artrite séptica aguda, artrite adjuvante, artrite ideopática juvenil, encefalomielite alérgica, rinite alérgica, vasculite alérgica, alergia, asma, aterosclerose, inflamação crónica devida a infeções crónicas virais ou bacterianas, doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD), doença da artéria coronária, encefalite, doença inflamatória intestinal, osteólise inflamatória, inflamação associada a reações de hipersensibilidade aguda e retardada, inflamação associada com tumores, lesão do nervo periférico ou doenças desmielinizantes, inflamação associada com trauma tecidual tais como queimaduras e isquemia, inflamação devida a meningite, síndrome de lesão de órgãos múltiplos, fibrose pulmonar, sepse e choque séptico, síndrome de Stevens-

Johnson, artropia indiferenciada, e espondiloartropatia indiferenciada.

Por "doenças infecciosas" aqui incluem-se doenças causadas por patógenos tais como vírus, bactérias, fungos, protozoários, e parasitas. As doenças infecciosas podem ser causadas por vírus incluindo adenovírus, citomegalovírus, dengue, Epstein-Barr, hanta, hepatite A, hepatite B, hepatite C, herpes simplex tipo I, herpes simplex tipo II, vírus da imunodeficiência humano, (HIV), papiloma vírus humano (HPV), gripe, sarampo, papeira, papova vírus, polio, vírus sincicial respiratório, peste bovina, rinovírus, rotavírus, rubéola, vírus SARS, varíola, meningite vírica, e afins. As doenças infecciosas podem também ser causadas por bactérias incluindo *Bacillus anthracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Diphtheria*, *E. coli*, *Legionella*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium rickettsia*, *Mycoplasma neisseria*, *Pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumonia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Vibria cholerae*, *Yersinia pestis*, e afins. As doenças infecciosas podem também ser causadas por fungos tais como *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffeii*, e afins. As doenças infecciosas podem também ser causadas por protozoários e parasitas tais como clamídia, kokzidioa, leishmania, malária, rickettsia, tripanosomas, e afins.

Além disso, os anticorpos da presente invenção podem ser usados para prevenir ou tratar condições adicionais incluindo mas não limitado a condições cardíacas tais como insuficiência cardíaca congestiva (CHF), miocardite e outras condições de miocárdio; doenças da pele tais como rosácea, acne, e eczema; condições ósseas e dentárias tais

como perda de osso, osteoporose, doença de Paget, histiocitose de células de Langerhans, doença periodontal, osteopénia por desuso, osteomalacia, displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa poliestótica, metástase óssea, tratamento da dor óssea, hipercalcemia maligna humoral, reconstrução periodontal, lesão da medula espinhal, e fraturas ósseas; condições metabólicas tais como doença de Gaucher; condições endócrinas tais como síndrome de Cushing; e condições neurológicas.

Um certo número de recetores que podem interagir com os anticorpos da presente invenção, são polimórficos na população humana. Para um dado doente ou população de doentes, a eficácia dos anticorpos da presente invenção pode ser afetada pela presença ou ausência de polimorfismo específico nas proteínas. Por exemplo, FcγRIIIA é polimórfico na posição 158, o qual é comumente ou V (alta afinidade) ou F (baixa afinidade). Foi observado que os doentes com o genotipo V/V homozigótico têm uma melhor resposta clínica ao tratamento com o anticorpo anti-CD20 Rituxan® (rituximabe), provavelmente porque estes doentes fazem uma resposta NK mais forte (Dall'Ozzo et al. (2004) Cancer Res. 64:4664-9). Polimorfismos adicionais incluem mas não são limitados a FcγRIIA R131 ou H131, e esses polimorfismos são conhecidos por aumentarem ou diminuir a ligação Fc e subsequente a atividade biológica, dependendo do polimorfismo dos anticorpos da presente invenção podem ligar preferencialmente a uma forma polimórfica particular de um recetor, por exemplo FcγRIIIA 158 V, ou ligam-se com uma afinidade equivalente a todos os polimorfismos na posição particular no recetor, por exemplo ambos os polimorfismos 158V e 158F de FcγRIIIA. Numa forma de realização preferida, os anticorpos da presente invenção que podem ter ligação equivalente a polimorfismos podem ser usados num anticorpo para eliminar a eficácia diferencial

observada nos doentes com diferentes polimorfismos. Uma tal propriedade pode dar uma maior coerência na resposta terapêutica e reduzir as populações de pacientes que não respondem. Essa variante Fc com idêntica ligação a polimorfismos recetores pode ter atividade biológica aumentada, tais como CMCA, CDC ou meia vida de circulação, ou em alternativa atividade diminuída, através da modulação da ligação aos recetores Fc relevantes. Os anticorpos da presente invenção podem ligar-se com maior ou menor afinidade a um dos polimorfismos de um recetor, ou acentuando a diferença existente ligando ou invertendo a diferença. Uma tal propriedade pode permitir a criação de terapêuticas especialmente adaptadas para a eficácia com uma população doente possuindo tal polimorfismo. Por exemplo, uma população doente possuindo um polimorfismo com um maior afinidade para um recetor inibitório tal como FcγRIIB pode receber um fármaco contendo um anticorpo com ligação reduzida para tal forma polimórfica do recetor, criando um fármaco com maior eficácia.

Os doentes podem ser triados para um ou mais polimorfismos com vista a predizer a eficácia dos anticorpos da presente invenção. Esta informação pode ser usada, por exemplo, para seleccionar doentes para incluir ou excluir de ensaios clínicos ou, pós-aprovação, para fornecer orientações aos médicos e doentes visando dosagens apropriadas e opções de tratamento. Por exemplo, em doentes que são homozigóticos ou heterozigóticos para fármacos de anticorpo FcγRIIIA 158F tal como o anti-CD20 mAb, Rituximabe são minimamente eficazes (Carton 2002 Blood 99: 754-758; Weng 2003 J. Clin. Oncol. 21: 3940-3947); tais doentes podem mostrar uma melhor resposta clínica aos anticorpos da presente invenção. Os doentes podem ser seleccionados para inclusão em ensaios clínicos para um anticorpo da presente invenção se o seu genótipo indica que eles são susceptíveis de

responder significativamente melhor a um anticorpo da presente invenção, em comparação com um ou mais terapêuticas de anticorpos atualmente utilizados. Dosagens apropriadas e regimes de tratamento são determinados usando essa informação do genótipo. Os doentes são selecionados para inclusão num ensaio clínico ou para a recepção de terapia pós-aprovação com base no seu genotipo de polimorfismo, onde tal terapia contém um anticorpo manipulado para ser especificamente eficaz para essa população, ou em alternativa onde tal terapia contém um anticorpo que não mostra atividade diferencial para as formas diferentes do polimorfismo.

São aqui divulgados testes de diagnóstico para identificar doentes que são igualmente para mostrar uma resposta clínica favorável para um anticorpo da presente invenção, ou que são igualmente para exibir uma resposta significativamente melhor quando tratados com um anticorpo da presente invenção versus uma ou mais terapêuticas de anticorpo correntemente usadas. Qualquer um de uma série de métodos conhecidos na técnica podem ser usados para determinar os polimorfismos de FcγR em humanos.

Além disso, os testes de prognóstico podem ser realizados em amostras clínicas tais como sangue e amostras de tecido. Esses testes podem ser ensaiados para a atividade da função efetora, incluindo mas não limitado a CMCA, CDC, fagocitose, e opsonização, ou para matar, independentemente do mecanismo, de células cancerosas ou patogénicas de outro modo.

Os ensaios CMCA, tal como os descritos previamente, podem ser usados para prever, para um doente específico, a eficácia de um dado anticorpo da presente invenção. Essa informação pode ser usada para identificar doentes para

inclusão ou exclusão nos ensaios clínicos, ou para consubstanciar decisões sobre dosagens apropriadas e regimes de tratamento. Essa informação pode também ser usada para selecionar um fármaco que contém um anticorpo particular que mostra superior atividade nesse ensaio.

Formulação

São contempladas composições farmacêuticas em que são formulados um anticorpo da presente invenção como definido nas reivindicações e um transportador farmacêuticamente aceitável. As formulações dos anticorpos da presente invenção podem ser preparadas para armazenamento por mistura do referido anticorpo com o desejado grau de pureza com transportadores, excipientes ou estabilizantes opcionais farmacêuticamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. Ed., 1980), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Transportadores, excipientes, ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para recipientes nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, acetato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilo amónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; fenol, álcool orbenzil butílico; alquil parabenos tais como as metil ou propil parabenos; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como

EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; adoçantes e outros agentes aromatizantes; enchimentos tais como celulose microcristalina, lactose, milho e outros amidos; agentes ligantes; aditivos; agentes de coloração; formadores de sais contraíções tais como sódio; complexos de metal (por exemplo complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG). Numa forma de realização preferida, a composição farmacêutica que compreende o anticorpo da presente invenção pode estar numa forma solúvel em água, tal como estar presente como sais farmaceuticamente aceitáveis, os quais se entende incluem tanto sais de adição de ácidos e bases. "Sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis" referem-se aos sais que retêm a eficiência biológica de bases livres e que não são biologicamente ou de outro modo indesejáveis, formados com ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e afins, e ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malônico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzóico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanesulfônico, ácido etanesulfônico, ácido p-toluenesulfônico, ácido salicílico e afins. "Sais de adição de base farmaceuticamente aceitáveis" incluem os derivados de bases inorgânicas tais como sais de sódio, potássio, lítio, amônio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês, alumínio e afins. Particularmente preferidos são os sais de amônio, potássio, sódio, cálcio, e magnésio. Sais derivados de bases orgânicas não tóxicas farmaceuticamente aceitáveis incluem sais de amins primárias, secundárias, e terciárias, amins substituídas incluindo amins substituídas que ocorrem naturalmente, amins cíclicas e resinas básicas de troca iônica, tais

como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, e etanolamina. As formulações a usar para administração *in vivo* são preferencialmente estéreis. Isto é prontamente realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis ou outros métodos.

Os anticorpos aqui divulgados podem também ser formulados como imunoliposomas. Um liposoma é uma vesícula pequena compreendendo vários tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensoativos que são úteis na aplicação de um agente terapêutico a um mamífero. Os liposomas que contêm o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, tais como descrito em Epstein et al., 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82:3688; Hwang et al., 1980, Proc Natl Acad Sci USA, 77:4030; US 4,485,045; US 4,544,545; e PCT WO 97/38731. Os liposomas com tempo de circulação melhorado são divulgados na US 5,013,556. Os componentes do liposoma são comumente dispostos numa formação em bicamada, similar à disposição das membranas biológicas. Liposomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina PEG-derivatizada (PEG-PE). Os liposomas são extrusados através de filtros de tamanho de poro definido para produzir liposomas com o diâmetro desejado. Um agente quimioterapêutico ou outro agente terapeuticamente ativo está opcionalmente contido no liposoma (Gabizon et al., 1989, J National Cancer Inst 81:1484).

O anticorpo e outros agentes terapeuticamente ativos podem também ser acondicionados em microcápsulas preparadas por métodos incluindo mas não limitados a técnicas de coacervação, polimerização interfacial (por exemplo usando

hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina, ou microcápsulas de poli-(metilmetacrilato)), sistemas de administração de fármaco coloidal (por exemplo, liposomas, microsferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas), e macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edição, Osol, A. Ed., 1980. Podem ser preparadas preparações de libertação sustentada. Exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímero sólido hidrofóbico, as quais matrizes são na forma de artigos moldados, por exemplo filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinilálcool)), polilactidos (US 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato, não degradável etileno acetato de vinilo, copolímeros de ácido láctico degradável-ácido glicólico tais como o Lupron Depot® (os quais são microsferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico, e ProLease® (disponível comercialmente da Alkermes), o qual é um sistema de aplicação à base de microsferas composto da desejada molécula bioativa incorporada numa matriz de poli-DL-láctido-co-glicolido (PLG).

Administração

A administração de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo da presente invenção, pode ser feita numa diversidade de modos, incluindo, mas não limitado a oralmente, subcutaneamente, intravenosamente, intranasalmente, intraoticamente, transdermicamente, topicamente (por exemplo, géis, pomadas, loções, cremes, etc.), peritonealmente intraEP, intramuscularmente,

intrapulmonar, vaginalmente, parentericamente, retalmente, ou intraocularmente. Em alguns casos, por exemplo para o tratamento de feridas, inflamação, etc., o anticorpo pode ser diretamente aplicado como uma solução ou spray. Como é conhecido na técnica, a composição farmacêutica pode ser formulada em conformidade, dependendo da forma de introdução.

A administração subcutânea pode ser preferível em algumas circunstâncias porque o doente pode auto administrar a composição farmacêutica. Muitas terapêuticas de proteína não são suficientemente potentes para permitir a formulação de uma dose terapeuticamente eficaz no volume máximo aceitável para administração subcutânea. Este problema pode ser tratado em parte pelo uso de formulações proteicas compreendendo arginina-LCP, histidina, e polisorbato (ver WO 04091658). Os anticorpos da presente invenção podem ser mais adequados para administração subcutânea devido a, por exemplo, potencia aumentada, meia vida sérica melhorada, ou solubilidade aumentada.

Como é conhecido na técnica, as terapêuticas de proteína são muitas vezes administradas por infusão IV ou bólus. Os anticorpos da presente invenção podem também ser aplicados usando esse método. Por exemplo, a administração venosa pode ser por infusão intravenosa com 0,9% de cloreto de sódio como veículo de infusão.

A administração pulmonar pode ser conseguida utilizando um inalador ou nebulizador e a formulação compreendendo um agente de formação de aerossóis. Por exemplo, pode ser usada tecnologia para inalação AERx® comercialmente disponível da Aradigm, ou sistema de administração pulmonar Inhance™ comercialmente disponível da Nektar Therapeutics. Os anticorpos da presente invenção podem ser mais adaptados

a administração intrapulmonar. O FcRn está presente no pulmão, e pode promover o transporte do pulmão para a corrente sanguínea (por exemplo Syntonix WO 04004798, Bitonti et al. (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101:9763-8). Consequentemente, os anticorpos que ligam FcRn mais eficientemente no pulmão ou que são libertados mais eficientemente na circulação sanguínea podem ter biodisponibilidade melhorada a seguir à administração intrapulmonar. Os anticorpos da presente invenção podem também ser mais favoráveis para administração intrapulmonar devido a, por exemplo, solubilidade melhorada ou ponto isoelétrico alterado.

Além disso, os anticorpos da presente invenção podem ser mais favoráveis para aplicação oral devido a, por exemplo, estabilidade melhorada a pH gástrico e resistência à proteólise aumentada. Além disso, FcRn parece ser expresso no epitélio intestinal de adultos (Dickinson et al. (1999) J. Clin. Invest. 104:903-11), portanto anticorpos com perfis de interação FcRn melhorados podem mostrar biodisponibilidade aumentada a seguir a administração oral. O transporte mediado por FcRn de anticorpos pode também ocorrer noutras membranas mucosas tais como as dos tratos gastrointestinal, respiratório, e genital (Yoshida et al. (2004) Immunity 20:769-83).

Além disso, uma quantidade de sistemas de administração são conhecidos na técnica e podem ser usados para administrar os anticorpos da presente invenção. Exemplos incluem, mas não são limitados a, encapsulação em liposomas, micropartículas, microesferas (por exemplo microesferas PLA/PGA), e afins. Em alternativa, pode ser usado um implante de um material poroso, não poroso, ou gelatinoso, incluindo membranas ou fibras. Sistemas de libertação sustentada podem compreender um material ou matriz

polimérico tal como poliésteres, hidrogéis, poli(álcool vinílico), polilactidos, copolímeros de ácido L-glutâmico e etil-L-glutamato, acetato de etilenovinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tais como os da Lupron Depot®, e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. É também possível administrar um ácido nucleico que codifica o anticorpo da corrente invenção, por exemplo por infecção retroviral, injeção direta, ou revestimento com lípidos, recetores de células de superfície, ou outros agentes de transfeção. Em todos os casos, sistemas de libertação controlada podem ser usados para libertar o anticorpo no ou perto do local de ação desejado.

Dosagem

As quantidades de dosagem e frequências de administração são selecionadas para serem terapêuticamente ou profilaticamente eficazes. Como é conhecido na técnica, os ajustes à degradação da proteína, libertação sistêmica versus libertação localizada, e taxa da síntese de nova protease, assim como a idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, tempo de administração, interação fármaco e a gravidade da condição pode ser necessária, e será determinável com a experimentação de rotina pelos especialistas na técnica.

A concentração do anticorpo terapêuticamente ativo na formulação pode variar desde cerca de 0,1 até 100 % em peso. Numa forma de realização preferida, a concentração do anticorpo é numa gama de 0,003 to 1,0 molar. Com vista a tratar o doente, pode ser administrada uma dose terapêuticamente eficaz do anticorpo da presente invenção. Por "dose terapêuticamente eficaz" aqui entende-se uma dose que produz os efeitos para os quais é administrado. A dose exata irá depender do objetivo do tratamento, e será

ajustável por um especialista na técnica usando técnicas conhecidas. As dosagens podem variar desde 0,0001 até 100 mg/kg de peso corporal ou maior, por exemplo 0,1, 1, 10, ou 50 mg/kg de peso corporal, com 1 até 10mg/kg sendo preferido.

Pode ser usada apenas uma única dose do anticorpo. Podem ser administradas doses múltiplas do anticorpo. O tempo decorrido entre administrações pode ser menos que 1 hora, cerca de 1 hora, cerca de 1-2 horas, cerca de 2-3 horas, cerca de 3-4 horas, cerca de 6 horas, cerca de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 48 horas, cerca de 2-4 dias, cerca de 4-6 dias, cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, ou mais que 2 semanas.

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados em regimes de dose metronómica, quer por infusão contínua ou administração frequente em períodos de repouso prolongado. Tal administração metronómica pode envolver dosagem a intervalos constantes sem períodos de repouso. Tipicamente esses regimes englobar dose baixa crónica ou infusão contínua por um período de tempo prolongado, por exemplo 1-2 dias, 1-2 semanas, 1-2 meses, ou até 6 meses ou mais. O uso de doses menores pode minimizar efeitos secundários e a necessidade de períodos de repouso.

[0203] O anticorpo da presente invenção e um ou mais de outros agentes profiláticos ou terapêuticos podem ser administrados ciclicamente ao doente. O ciclo terapêutico envolve a administração de um primeiro agente de uma só vez, um segundo agente a uma segundo tempo, opcionalmente agentes adicionais a tempos adicionais, opcionalmente um período de descanso, e depois repetir esta sequência de administração de um ou mais tempos. O número de ciclos é tipicamente desde 2 - 10. O ciclo terapêutico pode reduzir

o desenvolvimento de resistência a um ou mais agentes, pode minimizar os efeitos secundários, ou pode melhorar a eficácia de tratamento.

Terapias de combinação

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados concomitantemente com um ou mais de outros regimes ou agentes terapêuticos. Regimes ou agentes terapêuticos adicionais podem ser usados para melhorar a eficácia ou a segurança do anticorpo. Também, os regimes ou agentes terapêuticos adicionais podem ser usados para tratar a mesma doença ou uma comorbidade em vez de alterar a ação do anticorpo. Por exemplo, um anticorpo da presente invenção pode ser administrado ao doente juntamente com quimioterapia, terapia de radiação, ou a quimioterapia e a terapia de radiação. O anticorpo da presente invenção pode ser administrado em combinação com um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos, incluindo mas não limitado a agentes citotóxicos, agentes quimioterapêuticos, citocinas, agentes inibidores de crescimento, agentes anti-hormonais, inibidores de quinase, agentes antiangiogênicos, cardioprotetores, agentes imunoestimulantes, agentes imunossuppressores, agentes que promovem a proliferação de células hematológicas, inibidores da angiogénese, inibidores da proteína tirosina quinase (PTK), anticorpos adicionais, FcγRIIb ou outros inibidores de recetor Fc, ou outros agentes terapêuticos.

Os termos "em combinação com" e "co-administração" não são limitados à administração dos agentes profiláticos ou terapêuticos exatamente ao mesmo tempo. Em vez disso, entende-se que o anticorpo da presente invenção e o outro agente ou agentes podem ser administrados numa sequência e no tempo do intervalo de modo que eles podem atuar em

conjunto para fornecer um benefício que é aumentado versus tratamento com apenas um ou outro anticorpo da presente invenção ou o outro agente ou agentes. É preferível que o anticorpo e o outro agente ou agentes atuam aditivamente, e é especialmente preferido que atuem sinergicamente. Essas moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o fim pretendido. O prático clínico especialista pode determinar empiricamente, ou considerando as farmacocinéticas e modos de ação dos agentes, a dose ou doses apropriadas de cada agente terapêutico, assim como os timings e métodos de administração apropriados.

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados com uma ou mais moléculas adicionais compreendendo anticorpos ou Fc. Os anticorpos da presente invenção podem ser coadministrados com um ou mais outros anticorpos que têm eficácia no tratamento da mesma doença ou numa comorbilidade adicional; por exemplo podem ser administrados dois anticorpos que reconhecem dois antígenos que são sobreexpressados num dado tipo de cancro, ou dois antígenos que medeiam a patogénese de uma doença autoimune ou infecciosa.

Exemplos de anticorpos anti-cancro que podem ser coadministrados incluem, mas não são limitados a, anticorpos antígenos de superfície de células anti-17-1A tais como Panorex™ (edrecolomab); anticorpos anti-4-1BB; anticorpos anti-4Dc; anticorpos anti-A33 tais como A33 e CDP-833; anticorpos anti- $\alpha 4\beta 1$ integrina tais como natalizumab; anticorpos anti- $\alpha 4\beta 7$ integrina tais como LDP-02; anticorpos anti- $\alpha V\beta 1$ integrina tais como F-200, M-200, e SJ-749; anticorpos anti- $\alpha V\beta 3$ integrina tais como abciximab, CNTO-95, Mab-17E6, e Vitaxin™; anticorpos fator 5 (C5) anti-complemento tais como 5G1.1; anticorpos anti-

CA125 tais como OvaRex® (oregovomab); anticorpos anti-CD3 tais como Nuvion® (visilizumab) e Rexomab; anticorpos anti-CD4 tais como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A; anticorpos anti-CD6 tais como Oncolisina B e Oncolisina CD6; anticorpos anti-CD7 tais como HB2; anticorpos anti-CD19 tais como B43, MT-103, e Oncolisina B; anticorpos anti-CD20 tais como 2H7, 2H7.v16, 2H7.v114, 2H7.v115, Bexxar® (tositumomab, I-131 marcado anti-CD20), Rituxan® (rituximab), e Zevalin® (Ibritumomab tiuxetan, Y-90 marcado anti-CD20); anticorpos anti-CD22 tais como Lymphocide™ (epratuzumab, Y-90 marcado anti-CD22); anticorpos anti-CD23 tais como IDEC-152; anticorpos anti-CD25 tais como basiliximab e Zenapax® (daclizumab); anticorpos anti-CD30 tais como AC10, MDX-060, e SGN-30; anticorpos anti-CD33 tais como Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicin), Oncolisina M, e Smart M195; anticorpos anti-CD38; anticorpos anti-CD40 tais como SGN-40 e toralizumab; anticorpos anti-CD40L tais como 5c8, Antova™, e IDEC-131; anticorpos anti-CD44 tais como bivatumab; anticorpos anti-CD46; anticorpos anti-CD52 tais como Campath® (alemtuzumab); anticorpos anti-CD55 tais como SC-1; anticorpos anti-CD56 tais como huN901-DM1; anticorpos anti-CD64 tais como MDX-33; anticorpos anti-CD66e tal como XR-303; anticorpos anti-CD74 tais como IMMU-110; anticorpos anti-CD80 tais como galiximab e IDEC-114; anticorpos anti-CD89 tais como MDX-214; anticorpos anti-CD123; anticorpos anti-CD138 tais como B-B4-DM1; anticorpos anti-CD 146 tais como AA-98; anticorpos anti-CD148; anticorpos anti-CEA tais como cT84.66, labetuzumab, e Pentacea™; anticorpos anti-CTLA-4 tais como MDX-101; anticorpos anti-CXCR4; anticorpos anti-EGFR tais como ABX-EGF, Erbitux® (cetuximab), IMC-C225, e Merck Mab 425; anticorpos anti-EpCAM tais como anti-EpCAM de Crucell, ING-1, e IS-IL-2; anticorpos anti-efrina B2/EphB4; anticorpos anti-Her2 tais como Herceptin®, MDX-210; anticorpos anti-FAP (proteína de ativação de fibroblastos) tais como

sibrotuzumab; anticorpos anti-ferritina tais como NXT-211; anticorpos anti-FGF-1; anticorpos anti-FGF-3; anticorpos anti-FGF-8; anticorpos anti-FGFR, anticorpos anti-fibrina; anticorpos anti-G250 tais como WX-G250 e Rencarex®; anticorpos gangliósido anti-GD2 tais como EMD-273063 e TriGem; anticorpos anti-GD3 gangliósido tais como BEC2, KW-2871, e mitumomab; anticorpos anti-gpIIb/IIIa tais como ReoPro; anticorpos antiheparinase; anticorpos anti-Her2/ErbB2 tais como Herceptin® (trastuzumab), MDX-210, e pertuzumab; anticorpos anti-HLA tais como Oncolyn®, Smart 1D10; anticorpos anti-HM1.24; anticorpos anti-ICAM tais como ICM3; anticorpos recetores anti-IgA; anticorpos anti-IGr-1 tais como CP-751871 e EM-164; anticorpos anti-IGF-1R tais como IMC-A12; anticorpos anti-IL-6 tais como CNTO-328 e elsilimomab; anticorpos anti-IL-15 tais como HuMax™-IL15; anticorpos anti-KDR; anticorpos anti-laminina 5; anticorpos de antígeno anti-Lewis Y tais como Hu3S193 e IGN-311; anticorpos anti-MCAM; anticorpos anti-Muc1 tais como BravaRex e TriAb; anticorpos anti-NCAM tais como ERJC-1 e ICRT; anticorpos antígeno anti-PEM tais como Theragyn e Therex; anticorpos anti-PSA; anticorpos anti-PSCA tais como IG8; anticorpos anti-Ptk; anticorpos anti-PTN; anticorpos anti-RANKL tais como AMG-162; anticorpos anti-RLIP76; anticorpos antígeno anti-SK-1 tais como Monopharm C; anticorpos anti-STEAP; anticorpos anti-TAG72 tais como CC49-SCA e MDX-220; anticorpos anti-FCT- β tais como CAT-152; anticorpos anti-TNF- α tais como CDP571, CDP870, D2E7, Humira® (adalimumab), e Remicade® (infliximab); anticorpos anti-TRAIL-R1 e TRAIL-R2; anticorpos anti-VE-cadherin-2; e anticorpos anti-VLA-4 tais como Antegren™. Para além disso, anticorpos anti-idiotipo incluindo mas não limitados a epitopo GD3 de anticorpo BEC2 e o epitopo gp72 de anticorpo 105AD7, podem ser usados. Além disso, anticorpos biespecíficos incluindo mas não limitados ao anticorpo Bi20 anti-GD3/CD20 podem ser usados.

Exemplos de anticorpos que podem ser co-administrados para tratar doenças autoimune ou inflamatória, rejeição de transplante, GVHD, e afins incluem, mas não são limitados a, anticorpos integrina anti- $\alpha 4\beta 7$ tais como LDP-02, anticorpos integrina anti-beta2 tais como LDP-01, anticorpos anti-complemento (C5) tais como 5G1.1, anticorpos anti-CD2 tais como BTI-322, MEDI-507, anticorpos anti-CD3 tais como OKT3, SMART anti-CD3, anticorpos anti-CD4 tais como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, anticorpos anti-CD11a, anticorpos anti-CD14 tais como IC14, anticorpos anti-CD18, anticorpos anti-CD23 tais como IDEC 152, anticorpos anti-CD25 tais como Zenapax, anticorpos anti-CD40L tais como 5c8, Antova, IDEC-131, anticorpos anti-CD64 tais como MDX-33, anticorpos anti-CD80 tais como IDEC-114, anticorpos anti-CD147 tais como ABX-CBL, anticorpos anti-E-seletina tais como CDP850, anticorpos anti-gpIIb/IIIa tais como ReoPro/Abcixima, anticorpos anti-ICAM-3 tais como ICM3, anticorpos anti-ICE tais como VX-740, anticorpos anti-Fc γ R1 tais como MDX-33, anticorpos anti-IgE tais como rhuMab-E25, anticorpos anti-IL-4 tais como SB-240683, anticorpos anti-IL-5 tais como SB-240563, SCH55700, anticorpos anti-IL-8 tais como ABX-IL8, anticorpos anti-interferão gama, e anticorpos anti-TNF α tais como CDP571, CDP870, D2E7, Infliximab, MAK-195F, anticorpos anti-VLA-4 tais como Antegren. Exemplos de outras moléculas contendo Fc que podem ser co-administrados para tratar doença autoimune ou inflamatória, rejeição de transplante, GVHD, e afins incluem, mas não são limitados a, recetor p75 TNF /fusão de Fc Enbrel® (etanercept) e armadilha IL-1 da Regeneron.

Exemplos de anticorpos que podem ser co-administrados para tratar doenças infecciosas incluem, mas não são limitados a, anticorpos anti-antrax tais como ABthrax, anticorpos anti-

CMV tais como CytoGam e sevirumab, anticorpos anti-criptosporídio tais como CryptoGAM, Sporidin-G, anticorpos anti-helicobacter tais como Pyloran, anticorpos anti-hepatite B tais como HepeX-B, Nabi-HB, anticorpos anti-HIV tais como HRG-214, anticorpos anti-RSV tais como felvizumab, HNK-20, palivizumab, RespiGam, e anticorpos anti-staphylococcus tais como Aurexis, Aurograb, BSYX-A110, e SE-Mab.

Em alternativa, os anticorpos da presente invenção podem ser co-administrados ou com uma ou mais outras moléculas que compete para a ligação a um ou mais recetores Fc. Por exemplo, co-administrar inibidores do FcγRIIb recetor inibidor pode resultar na função efetora aumentada. De modo semelhante, a co-administração de inibidores dos recetores de ativação tais como FcγRIIIa podem minimizar a função efetora não desejada. Os inibidores de recetor Fc incluem, mas não são limitados a, moléculas Fc que são manipuladas para atuar como inibidores competitivos para ligar a FcγRIIb FcγRIIIa, ou outros recetores Fc, assim como outras imunoglobulinas e especificamente o tratamento chamado IVIg (imunoglobulina intravenosa). O inibidor pode ser administrado e permitir atuar antes do anticorpo ser administrado. Uma via alternativa para atingir o efeito de doseamento sequencial deve ser fornecer uma forma de dosagem de libertação imediata do inibidor recetor Fc e depois uma formulação de libertação sustentada do anticorpo da invenção. As formulações de libertação imediata e de libertação controlada podem ser administrados separadamente ou ser combinados numa forma de unidade de dosagem. A administração de um inibidor FcγRIIb pode também ser usado para limitar respostas imunes não desejadas, por exemplo resposta a anticorpo anti-Fator VIII a seguir a administração do Fator VIII a hemofílicos.

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados com um agente quimioterapêutico. Por "agente quimioterapêutico" como aqui usado entende-se um composto químico útil no tratamento de cancro. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem mas não são limitados a agentes de alquilação tais como tiotepa e ciclosfosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo tais como busulfano, improsulfano e piposulfano; androgénios tais como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; antiandrogénios tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, e goserelina; antibióticos tais como aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptoizocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-estrogénios incluindo por exemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles de inibição de aromatase, 4-hifroxitamoxifeno, trioxifeno, quetoxifeno oxifeno, LY 117018, onapristona, e toremifeno (Fareston); anti-metabolitos tais como metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU); análogos do ácido fólico tais como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosfaoramida e trimetilolomelamina; repositores de ácido fólico tais como ácido frolínico; mostardas de azoto tais como clorambucilo, clornafazina,

colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mustarda uracilo; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; proteínas tais como arginina deiminase e asparaginase; análogos da purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; taxanos, por exemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) e docetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); RFS 2000 inibidor de topoisomerase; inibidor da timidilato sintase (tais como Tomudex); quimioterapêuticos adicionais incluindo aceglatona; glicósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; difluorometilornitina (DMFO); elformitina; acetato de eliptinio; etoglucida; nitrato de gálio; hifroxiureia; lentinana; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK®; razoxano; sizofurano; espirogermânio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclolorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CT-11; ácido retinóico; esperamicinas;

capecitabina. Sais, ácidos ou derivados, farmaceuticamente aceitáveis, de qualquer dos acima podem também ser usados.

Um quimioterapêutico ou outro agente citotóxico podem ser administrados como pró-fármaco. Por "pró-fármaco" como aqui usado entende-se um precursor ou forma derivada de uma substância farmaceuticamente ativa ou seja menos citotoxicidade para células tumorais em comparação com o fármaco parente e é capaz de ser ativado enzimaticamente ou convertido numa forma parente mais ativa. Ver, por exemplo Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615^o Meeting Belfast, 14:375-382; Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery; e Borchardt et al., (ed.): 247-267, Humana Press, 1985. Os pró-fármacos podem ser pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos contendo péptido, pró-fármacos modificados com D-aminoácido, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos contendo beta-lactâmicos, pró-fármacos contendo opcionalmente fenoxiacetamida substituída ou pró-fármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, 5-fluorocitosina e outros pró-fármacos 5-fluorouridina que podem ser convertidos no fármaco citotóxico mais ativo isento de citotoxicidade. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivatizados numa forma de pró-fármaco para uso com os anticorpos da presente invenção incluem mas não são limitados a qualquer dos agentes quimioterapêuticos acima mencionados.

Uma diversidade de outros agentes terapêuticos podem encontrar utilização para administração com os anticorpos da presente invenção. O anticorpo pode ser administrado com um agente anti-angiogénico. Por "agente anti-angiogénico" como aqui usado entende-se um composto que bloqueia, ou interfere em algum grau, no desenvolvimento dos vasos

sanguíneos. O fator anti-angiogénico pode, por exemplo, ser uma molécula pequena ou uma proteína, por exemplo um anticorpo, fusão Fc, ou citocina, que liga a um fator de crescimento ou recetor de fator de crescimento envolvido na promoção da angiogénese. O fator anti-angiogénico preferido aqui é um anticorpo que se liga ao Fator de Crescimento Vascular Endotelial (FCVE). Outros agentes que inibem a sinalização através de FCVE podem também ser usados, por exemplo terapêuticos à base de RNA que reduzem os níveis de FCVE ou a expressão de FCVE-R, fusões da toxina FCVE, ratoeira de FCVE Regeneron, e anticorpos que ligam FCVE-R. Numa forma de realização alternativa, o anticorpo é administrado com um agente terapêutico que induz ou aumenta a resposta adaptativa imunológica, por exemplo um anticorpo que visa CTLA-4. Agentes anti-angiogénese adicionais incluem, mas não são limitados a, angiostatina (fragmento de plasminogénio), antitrombina III, angiozima, ABT-627, Bay 12-9566, benefina, bevacizumab, bisfosfonatos, BMS-275291, inibidor derivado de cartilagem (CDI), CAI, CD59 fragmento de complemento, CEP-7055, Col 3, combretastatina A-4, endostatina (fragmento colagénio XVIII), inibidores da farnesil transferase, fragmento de fibronetina, gro-beta, halofuginona, heparinases, fragmento de exassacáridos heparina, HMV833, gonadotropina coriónica humana (hCG), IM-862, interferão alfa, interferão beta, interferão gama, proteína indutível por interferão 10 (IP-10), interleucina-12, kringle 5 (fragmento de plasminogénio), marimastato, inibidores da metaloproteínase (por exemplo TIMPs), 2-metodiestradiol, MMI 270 (CGS 27023A), inibidor de ativador de plasminogénio (PAI), fator-4 plaquetário (PF4), prinomastato, fragmento de prolactina 16kDa, proteína relacionada com proliferina (PRP), PTK 787/ZK 222594, retinoides, solimastato, esqualamina, SS3304, SU5416, SU6668, SU11248, tetrahydrocortisol-S, tetratiomolibdato, talidomida, trombospondina-1 (TSP-1),

TNP-470, transformação do fator de crescimento beta (FCT-3), vasculostatina, vasostatina (fragmento de calreticulina), ZS6126, e ZD6474.

O anticorpo pode ser administrado com um inibidor da tirosina quinase. Por "inibidor da tirosina quinase" como aqui usado entende-se uma molécula que inibe em alguma extensão a atividade da tirosina quinase de uma tirosina quinase. Exemplos desses inibidores incluem mas não são limitados a quinazolininas, tais como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolinina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tais como CGP 59326, CGP 60261 e CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo(2,3-d) pirimidinas; curcumina (metano diferulolóilo, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas contendo porções nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por exemplo as que se ligam a ácido nucleico codificando ErbB); quinoxalinas (US 5,804,396); trifostinas (US 5,804,396); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering A G); inibidores de pan-ErbB tais como C1-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); Mesilato de imatiniba (STI571, Gleevec®; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); C1-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); ou como descrito em qualquer dos seguintes pedidos de patente: US 5,804,396; PCT WO 99/09016 (American Cyanamid); PCT WO 98/43960 (American Cyanamid); PCT WO 97/38983 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06378 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06396 (Warner-Lambert); PCT WO 96/30347 (Pfizer, Inc); PCT WO 96/33978 (AstraZeneca); PCT WO96/3397 (AstraZeneca); PCT WO 96/33980 (AstraZeneca), gefitinib (IRESSA™, ZD1839, AstraZeneca), e OSI-774 (Tarceva™, OSI Pharmaceuticals/Genentech).

O anticorpo pode ser administrado com um ou mais agentes imunomoduladores. Tais agentes podem aumentar ou diminuir a produção de uma ou mais citocinas, apresentação auto-antigénio regulado para cima ou para baixo, antigénios máscara de MHC, ou promove a proliferação, diferenciação, migração, ou estado de ativação de uma ou mais tipos de células imunitárias. Agentes imunomoduladores incluem mas não limitados a: fármacos anti-inflamatórios não esteróides (NSAIDs) tais como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenac, etodolac, fenoprofeno, indometacina, cetorolaco, oxaprozina, nabumentona, sulindaco, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, cetoprofeno, e nabumetona; esteróides (por exemplo glucocorticóides, dexametasona, cortisona, hifroxicortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, trimcinolona, azulfidineicosanóides tais como prostaglandinas, tromboxanos, e leucotrienos; assim como esteróides tópicos tais como antralina, calcipotrieno, clobetasol, e tazaroteno); citocinas tais como TGF β , IFN α , IFN β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10; citocina, quemocina, ou antagonistas de recetor incluindo anticorpos, recetores solúveis, e fusões recetor Fc contra BAFF, B7, CCR2, CCR5, CD2, CD3, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD14, CD15, CD17, CD18, CD20, CD23, CD28, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD52, CD64, CD80, CD86, CD147, CD152, fatores de complemento (C5, D) CTLA4, eotaxina, Fas, ICAM, ICOS, IFN α , IFN β , IFN γ , IFNAR, IgE, IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5R, IL-6, IL-8, IL-9 IL-12, IL-13, IL-13R1, IL-15, IL-18R, IL-23, integrinas, LFA-1, LFA-3, MHC, seletinas, TGF β , TNF α , TNF β , TNF-R1, recetor da célula T, incluindo Enbrel® (etanercept), Humira® (adalimumab), e Remicade® (infliximab); heterólogos globulina anti-limfócito; outras moléculas imunomoduladoras tais como pirimidinas substituídas 2-amino-6-aryl-5, anticorpos anti-idiotípicos para péptidos ligado a MHC e fragmentos MHC, azatioprina, brequinar, bromocriptina, ciclofosfamida, ciclosporina A, D-penicilamina,

deoxispergualina, FK506, glutaraldeído, ouro, hifroxiclороquina, leflunomida, malononitriloamidas (por exemplo leflunomida), metotrexato, monocíclica, mizoribina, micofenolato de mofetilo, rapamicina, e sulfasasazina.

Anticorpos da presente invenção podem ser administrados com uma citocina. Por "citocina" como aqui usado entende-se um termo genérico para proteínas libertadas por uma população de células que atuam noutra célula como mediadores intercelulares. Exemplos de tais citocinas são linfoquinas, monoquinas, e hormonas polipeptídicas tradicionais. Incluído entre as citocinas estão hormonas de crescimento tais como hormonas de crescimento humanas, hormonas N-metionilo de crescimento humanas, e hormona de crescimento de bovino; hormona paratiróide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormona glicoproteína tais como hormona de estimulação de folículo (HEF), hormona estimulante da tiróide (TSH), e hormona luteinizante (HL); fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblasto; prolactina; lactogénio placentário; fator alfa e beta de necrose tumoral; substância inibidora mülleriana; péptido associado a gonadotropina de rato; inibitina; activina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fator de crescimento neural tal como FEC-beta; fator de crescimento plaquetário; fator de crescimento transformador (TGFs) tais como FCT-alfa e FCT-beta; fator I e II de crescimento tipo insulina; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferões tais como interferão-alfa, beta, e gama; fatores de estimulação de colónia (CSFs) tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulocitemacrófago-CSF (GM-CSF); e granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, um fator de necrose tumoral tais como TNF-alfa ou TNF-beta; e outros fatores polipeptídicos incluindo

LIF e kit ligando (KL). Como aqui usado, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de células recombinantes, e biologicamente ativos equivalentes das citocinas da sequência nativa.

Citocinas ou outros agentes que estimulam células do sistema imunitário pode ser co-administrado com o anticorpo da presente invenção. Um tal modo de tratamento pode aumentar a função efetora desejada. Por exemplo, agentes que estimulam as células NK, incluindo mas não limitado a IL-2 podem ser co-administradas. Numa outra forma de realização, podem ser co-administrado os agentes que estimulam macrófagos, incluindo mas não limitado a C5a, péptidos formilo tais como N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (Beigier-Bompadre et al. (2003) Scand. J. Immunol. 57: 221-8). Também podem ser administrados, agentes que estimulam os neutrófilos, incluindo mas não limitados a G-CSF, GM-CSF, e afins. Além disso, podem ser usados agentes que promovem a migração dessas citocinas imunoestimuladoras. Também agentes adicionais incluindo mas não limitados a interferão gama, IL-3 e IL-7 podem promover uma ou mais funções efetoras.

Citocinas ou outros agentes que inibem a função efetora da célula podem ser co-administradas com o anticorpo da presente invenção. Um tal modo de tratamento pode limitar a função efetora não desejada.

O anticorpo pode ser administrado com um ou mais antibióticos, incluindo mas não limitado a: antibióticos aminoglicósido (por exemplo apramicina, arbecacina, bambermicinas, butirosina, dibecacina, gentamicina, canamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, espectrinomicina), aminociclitois (por exemplo esprectinomicina), antibióticos

anfenicol (por exemplo azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol, e tianfenicol), antibióticos ansamicina (por exemplo rifamida e rifampina), carbapenemas (por exemplo imipenema, meropenema, panipenema); cefalosporina (por exemplo cefaclor, cefadroxil, cefamandole, cefatrizina, cefazedona, ceftiofeno, cefpimizole, cefpiramida, cefpiroma, cefprozil, cefuroxina, cefixima, cefalexina, cefradina), cefamicinas (cefbuperazona, cefoxitina, cefminox, cefmetazole, e cefotetano); lincosamidas (por exemplo clindamicina, lincomicina); macrolida (por exemplo azitromicina, breveldina A, claritromicina, eritromicina, roxitromicina, tobramicina), monobactâmicos (por exemplo aztreoname, carumoname, e tigemoname); mupirocina; oxacefemas (por exemplo flomoxef, latamoxef, e moxalactame); penicilinas (por exemplo amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, amoxicilina, bacampicilina, ácido benzilpenicilínico, benzilpenicilina de sódio, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamecilina, penetamato iodidrato, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, benzoato de penicilina V, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina, e fencihicilina de potássio); polipéptidos (por exemplo bacitracina, colistina, polimixina B, teicoplanina, vancomicina); quinolonas (amifloxacina, cinoxacina, ciprofloxacina, enoxacina, enrofloxacina, feroxacina, flumequina, gatifloxacina, gemifloxacina, grepafloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, ácido oxolínico, pefloxacina, ácido pipemídico, rosoxacina, rufloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, tosufloxacina, trovafloxacina); rifampina; estreptograminas (por exemplo quinupristina, dalfopristina); sulfonamidas (sulfanilamida, sulfametoxazole); tetraciclenos (clortetraciclina, hidrocloreto de demeclociclina, demetilclortetraciclina, doxiciclina, duramicina, minociclina, neomicina,

oxitetraciclina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina).

Agentes antifúngicos tais como anfotericina B, ciclopirox, clotrimazole, econazole, fluconazole, flucitosina, itraconazole, cetonaconazole, niconazole, nistatina, terbinafina, terconazole, e tioconazole podem também ser usados.

Agentes antivirais incluindo inibidores da protease, inibidores da transcriptase reversa, e outros, incluindo interferões tipo I, inibidores de fusão viral, e inibidores de neuramidase, podem também ser usados. Exemplos de agentes antivirais incluem, mas não são limitados a, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, clevadina, enfuvirtida, entecavir, foscarnet, gangciclovir, idoxuridina, indinavir, lopinavir, pleconarilo, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, trifluridina, vidarabina, e zidovudina, podem ser usados.

Os anticorpos da presente invenção podem ser combinados com outros regimes terapêuticos. Por exemplo, o doente a ser tratado com um anticorpo da presente invenção pode também receber terapia de radiação. A terapia de radiação pode ser administrada de acordo com protocolos comumente empregues na técnica e conhecidos dos especialistas na técnica. Tal terapia inclui mas não é limitada a radiação de célio, irídio, iodo, ou cobalto. A terapia de radiação pode ser irradiação no corpo inteiro, ou pode ser dirigida localmente para um sítio específico ou tecido em ou sobre o corpo, tais como pulmão, bexiga, ou próstata. Tipicamente, a terapia de radiação é administrado em pulsos ao longo de um período de tempo desde cerca de 1 até 2 semanas. A terapia de radiação pode, no entanto, ser administrada durante períodos de tempo mais longos. Por exemplo, a

terapia de radiação pode ser administrada a doentes com cancro da cabeça e pescoço durante cerca de 6 até cerca de 7 semanas. Opcionalmente, a terapia de radiação pode ser administrada como uma dose única ou como doses múltiplas, sequenciais. O médico especialista pode determinar empiricamente a dose ou doses apropriadas de terapia de radiação útil aqui. O anticorpo da presente invenção e uma ou mais outras terapias anti-cancro, podem ser empregues para tratar células cancerígenas *ex vivo*. É contemplado que esse tratamento *ex vivo* pode ser útil no transplante na medula óssea e particularmente, transplantes autólogos de medula óssea. Por exemplo, o tratamento de células e tecido(s) contendo células cancerígenas com anticorpo e uma ou mais outras terapias anti-cancro, tais como descrito acima, pode ser empregue para destruírem ou destruírem praticamente as células cancerígenas antes do transplante num doente recetor.

Está evidentemente contemplado que os anticorpos da invenção podem empregar em combinação ainda com outras técnicas terapêuticas tais como cirurgia ou fototerapia.

EXEMPLOS

Exemplos são fornecidos abaixo para ilustrar a presente invenção. Estes exemplos não se destinam a limitar a presente invenção a qualquer aplicação ou teoria particular de operação.

Como referência às regiões variáveis de imunoglobulina, as posições são numeradas de acordo com o esquema de numeração de Kabat. Como referência às regiões constantes de imunoglobulina, as posições são numeradas de acordo com o índice EU como em Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States

Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda).

Exemplo 1. Anticorpos anti-CD19 com modificações de aminoácido que aumentam a função efetora

Os anticorpos anti-CD19 da invenção destinam-se a candidatos clínicos para terapêutica anti-câncer. Para investigar a possibilidade de melhorar a função efetora de um anticorpo que visa CD19, versões variantes de anticorpos anti-CD19 foram manipuladas.

A Figura 6 fornece algumas sequências da região variável da cadeia pesada e leve dos anticorpos anti-CD19 4G7 (Meeker, T.C. et al. 1984. *Hybridoma*. 3: 305-320) e HD37 (Pezzuto, A. et al. 1987. *J. Immunol.* 138: 2793-2799) usados no presente estudo. As cadeias pesada e leve do parente quimérico de ratinho são marcadas com H0 4G7, H0 HD37, L0 4G7, e L0 HD37 respectivamente. As variantes da presente invenção podem ser feitas no contexto do anticorpo B43 anti-CD19 (Uckun, F.M. et al. 1998. *Blood*. 71: 13-29) as quais têm propriedades similares a HD37 e partilham idênticas CDRs e uma identidade de sequência total de 97% em relação às sequências HD37 H0 e L0 mostrada na Figura 6. Os genes para WT 4G7 e HD37 VH e VL de murino, designados H0 e L0 respectivamente, foram construídos usando técnicas de síntese genéticas e subclonagem no vetor de expressão de mamífero pcDNA3.1Zeo (Invitrogen) compreendendo as regiões constantes de IgG1 de cadeia pesada e leve kappa (Ck) de comprimento total. A variante S239D/I332E (função efetora anti-CD19 aumentada) foi construída na região Fc de um anticorpo híbrido IgG1/IgG2 (referido como "Híbrido", Figura 2) no vetor pcDNA3.1Zeo usando técnicas de mutagenese QuikChange (Stratagene). Todas as sequências foram sequenciadas para confirmar a fidelidade da

sequência. Os plasmídeos contendo gene de cadeia pesada (VH-CH1-CH2-CH3) (tipo selvagem ou variantes) foram co-transfetados com plasmídeo contendo gene de cadeia leve (VL-CL κ) para as células 293T. Os meios foram colhidas 5 dias após transfeção, e os anticorpos foram purificados a partir do sobrenadante usando cromatografia de afinidade de proteína A (Pierce, Catalog # 20334)

As afinidades de ligação relativas do Híbrido 4G7 S239D/I332E e do anticorpo 4G7 IgG1 foram calculadas através da determinação dos parâmetros de ligação num Biacore™ usando um painel de recetores Fc (Figura 7). Resumidamente, a proteína A/G foi acoplada a um fluxo de células dum chip CM5. A IgG foi primeiro diluída até 25 nM e imobilizada a proteína A / G de canal ~ 1000 RUs. O Fc γ R-His foi seriadamente diluído e injetado a 30 mL/min durante 2 min seguido por dissociação durante 3 min. Para determinar KD os sensogramas resultantes são "ajustados ao grupo" usando o modelo de interação 1:1 disponível no software de avaliação BIA. Os valores de KD que eram mais altos que 5×10^{-6} M são marcados como ND (não determinados) na Figura 7. Os dados indicam que o anticorpo WT IgG1 se liga a V158 Fc γ RIIIa com uma afinidade de aproximadamente 240 nM, consistentes com a literatura (Okazaki et al, 2004, J Mol Biol 336:1239-49; Lazar et al, Proc Natl Acad Sci USA 103(11):4005-4010). A versão variante Fc liga-se a V158 Fc γ RIIIa com uma afinidade de cerca de 4,7 nM, indicando um aumento de afinidade de cerca de 50 vezes em relação a WT. A ligação da variante anti-CD19 a F158 Fc γ RIIIa é cerca de 16,7 nM.

Para medir a capacidade das variantes de anticorpo para mediar a função efetora contra as células expressando CD19, a função efetora aumentada do anti-CD19 foi testada num ensaio CMCA de base celular.

Monócitos do sangue periférico humano (CMSPs) foram isolados dos leukopaks e usados como células efetoras, e foram usadas células cancerígenas CD19 positivas como células alvo. As células alvo foram semeadas em placas de 96 poços com 10,000 (Raji e MEC-1) e 20,000 (SUP-B15) células/poço e tratadas com os anticorpos específicos em triplicado. Os CMSPs isolados usando um gradiente Ficoll foram adicionados em excesso às células alvo e cocultivadas durante 4 h antes de processamento quanto à atividade LDH usando o Kit de Detecção de Citotoxicidade de acordo com as instruções do fabricante. A Figura 8a mostra os resultados do ensaio CMCA de comparação dos anticorpos 4G7 IgG1 e 4G7 Híbrido S239D/I332E, e HD37 IgG1 e HD37 Híbrido S239D/I332E na linha de células Daudi (LB). A Figura 8b mostra os resultados do ensaio CMCA de comparação de anticorpos 4G7 IgG1 e 4G7 Híbrido S239D/I332E, e anti-CD20 rituximab nas linhas de células SUP-B15 (LLA) e Raji (Linfoma de Burkitt). Os gráficos mostram que os anticorpos diferem não somente no seu EC50, refletindo a sua potência relativa, mas também o nível máximo de CMCA esperado pelos anticorpos a concentrações de saturação, refletindo a sua eficácia relativa. Melhorias consideráveis na potência e eficácia são observadas para as variantes de anticorpo Fc em comparação com o anticorpo com a região Fc WT. O anticorpo IgG1 quimérico tem muito pouca eficácia ou potência.

A EC50 da curva de dose response tal como o da Figura 8 representa a concentração de um composto em que é observado 50% do seu efeito máximo. Num contexto clínico, a potência reflete a concentração do anticorpo necessária para realizar o seu efeito terapêutico. Assim os dados da Figura 8 mostram que os anticorpos anti-CD19 otimizados em Fc atuam in vivo a uma concentração ou dose menor que aquela de um anti-CD19 WT ou anticorpo anti-CD20. Na Figura 8b,

enquanto WT IgG21 anti-CD19 à concentração de saturação medeia aproximadamente 10% de CMCA máximo, a Variante Fc anti-CD19 lisa aproximadamente 60% das células alvo. Num contexto clínico, a eficácia reflete o benefício terapêutico máximo do fármaco administrado.

Exemplo 2. Ligação de um anticorpo anti-CD19 de funções efetoras aumentadas para uma linha de células tumorais derivadas das células B

Mediu-se a ligação relativa do Híbrido 4G7 S239D/I332E à linha de células Raji. Foram determinadas as afinidades da função efetora melhorada das variantes anti-CD19 usando o sistema DELFIA® (PerkinElmer Life Sciences) o qual é baseado em Fluorometria Resolvida no Tempo (FRT). O anti-CD19 (H0L0) é marcado com Európio usando o kit Eu-Labeling disponível na PerkinElmer Biosciences. O tipo selvagem não marcado (WT) ou variantes (frio) são diluídos seriadamente (tipicamente partindo de 1 μ M) em passos de log 2 e misturado com uma concentração fixada de anti-CD19 marcado (ou quente). A mistura de anticorpos "quente" e "frio" é depois adicionada a 100,000 Células Raji (que têm uma alta densidade de superfície expressaram o antígeno CD-19) e incubada em gelo durante 30 min. O ensaio é aplicado essencialmente como um ensaio de competição para triagem dos anticorpos anti-CD19 de afinidades diferentes. Na ausência de variantes de competição de afinidade, o Eu-anti-CD19 e CD19 de superfície interagem e produzem um sinal a 613 nm quando o Európio é excitado a 340 nm. A adição do tipo selvagem ou variante compete com a interação Eu-anti-CD19-CD19, reduzindo quantitativamente a fluorescência para viabilizar a determinação das afinidades de ligação relativa. A Figura 9 mostra resultados de um ensaio de ligação de superfície celular de anti-CD19 de

função efetora melhorada a células Raji. Como pode ser observado, o valor EC50 calculado é 1,2 nM.

Exemplo 3. CMCA de um anticorpo anti-CD19 com citotoxicidade aumentada contra linhas de células de linfoma múltiplo.

Com vista a avaliar as propriedades citotóxicas do anti-CD19 de função efetora aumentada, foram realizados ensaios CMCA sobre um painel de 14 linhas de células representando vários linfomas e leucemias (Figura 10a). As linhas de células testadas eram linhas de células DoHH-2 e SC1 de Linfoma Folicular (LF); linha de células Jeko-1 de Linfoma das Células do Manto (LCM); linhas de células Daudi e Raji de Linfoma de Burkitt (LB); linhas de células MEC1 e WaC3CD5 da Leucemia Linfocítica Crónica (LLC); linha de células Bonna-12 da Leucemia das Células Pilosas (LCP); linha de células BV-1.73 da Leucemia Mielogénica Crónica (LMC); e linhas de células VAL, SUP-B15, NALM-6, RS4;11, e 697 de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Os monócitos do sangue periférico humano (CMSPs) foram isolados a partir de leukopaks e usados como células efetoras, e as células cancerígenas CD19 positivas foram usadas como células alvo. As células alvo foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com os anticorpos específicos em triplicado. As CMSPs isoladas usando um gradiente de Ficoll foram adicionadas em excesso às células alvo e cocultivadas durante 4 h antes de processadas quanto à atividade LDH usando o Kit de Detecção de Citotoxicidade de acordo com as instruções do fabricante. Ambos os parâmetros, potência (EC50) e eficácia (% CMCA) foram normalizados com os do rituximab (anti-CD20). Esta triagem demonstrou a superioridade citotóxica *in vitro* do anti-CD 19 de função efetora aumentada sobre uma vasta gama de linhas de células, especialmente as representando a doença

linfoproliferativa que se origina nos estados precoces do desenvolvimento das células B. A Figura 10b lista as linhas de células usadas e seus tipos de cancro correspondentes.

Exemplo 4. Anticorpos anti-CD19 com reduzido potencial de imunogenicidade.

Devido a um vasto uso de tecnologia de hibridoma, um número substancial de anticorpos são derivados de fontes não humanas. No entanto, as proteínas não humanas são frequentemente imunogénicas quando administradas a humanos, reduzindo grandemente setes modo a utilidade terapêutica. A imunogenicidade é o resultado de uma série complexa de respostas a uma substância que é percebido como estranho e pode incluir a produção de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes, formação de complexos imunes, ativação de complemento, ativação de mastócitos, inflamação, respostas de hipersensibilidade, e anafilaxia. Vários fatores podem contribuir para a imunogenicidade de proteína, incluindo mas não limitado a sequência de proteína, via e frequência de administração, e população doentes. A imunogenicidade pode limitar a eficácia e a segurança de uma proteína terapêutica por múltiplas vias. A eficácia pode ser reduzida diretamente através da formação de anticorpos neutralizadores. A eficácia pode também ser reduzida indiretamente, por ligação a anticorpos quer neutralizantes quer não neutralizantes tipicamente conduz a rápida eliminação a partir de soro. Podem ocorrer graves efeitos secundários e mesmo morte quando surge uma reação imunológica. Assim numa forma de realização preferida, a manipulação da proteína é usada para reduzir a imunogenicidade das proteínas alvo CD19 da presente invenção.

Com vista a reduzir o potencial de imunogenicidade das proteínas anti-CD19 da presente invenção, a imunogenicidade dos anticorpos 4G7 e HD37 anti-CD 19 foi reduzida usando um método descrito na US 2006/0008883, intitulada "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof", registada em 6 de dezembro, 2004. Os métodos reduzem o potencial de imunogenicidade através do aumento do conteúdo humano de sequência do anticorpo por meio de mutações. As cadeias pesada e leve com reduzido potencial para a imunogenicidade são chamadas H1, H2, H3, H4, etc e L1, L2, L3, etc. e são mostradas nas Figuras 11 até 14. As cadeias pesada e leve dos anticorpos originais, 4G7 e HD37, são referidas como H0 e L0, respetivamente. Combinações das diferentes cadeias pesadas e leves foram expressas e os anticorpos resultantes, com nomes tais como H3L3, H3/L3 ou H3_L3, foram purificadas e examinadas. Os anticorpos anti-CD19 foram expressos pela transfeção transiente dos vetores de acordo com as cadeias pesada e leve no crescimento das células 293T em 10% de IgG ultra-baixa de soro fetal de bovino com 1mM de piruvato de sódio e 1X aminoácidos não essenciais (Gibco®, Invitrogen Hayward CA). Cinco dias após a transfeção, o meio de cultura foi removido e passado através de uma coluna de proteína A (Pierce Biotechnology Inc, Rockford MD). As cadeias pesadas podem ser feitas com qualquer tipo de domínio constante incluindo, em humanos, IgG1, IgG2 e híbridos compreendendo IgG1 e IgG2 assim como domínios constantes de ratinho tais como IgG1 e IgG2a, que podem ser referidos como mIgG1 e mIgG2a. As sequências de cadeias pesadas humanas podem ser encontradas na Figura 2. Foi medida a ligação relativa de variantes anti-CD19 com reduzida imunogenicidade para uma linha de células Raji. As afinidades de imunogenicidade reduzida das variantes anti-CD19 foram determinadas usando o sistema DELFIA® (PerkinElmer Life Sciences) que é baseado em Fluorometria

Resolvida no Tempo (FRT). O Anti-CD19 é marcado com Európio usando o kit Eu-Labeling disponível da PerkinElmer Biosciences. Tipo selvagem (WT) não marcado ou variantes (frio) são diluídos seriadamente (partindo tipicamente de 1 μ M) em passos $\frac{1}{2}$ log e misturados com uma concentração fixada de anti-CD19 marcado (ou quente). A mistura de anticorpos "quentes" e "frios" são depois adicionados a 100,000 células Raji (que têm uma alta densidade de antígeno CD-19 expresso de superfície) e incubadas em gelo durante 30 min. O ensaio é essencialmente aplicado como um ensaio de competição para triar anticorpos anti-CD19 de afinidades diferentes. Na ausência de variantes de competição de afinidade, Eu-anti-CD19 e CD19 de superfície interagem e produzem um sinal a 613 nm quando o Európio é excitado a 340 nm. A adição do tipo selvagem ou variante compete com interação Eu-anti-CD19 - CD 19, reduzindo quantitativamente a fluorescência para viabilizar a determinação de afinidades de ligação relativa. A Figura 15a mostra os resultados de um ensaio de ligação de superfície celular de variantes 4G7 de imunogenicidade reduzida a células Raji. Com base na afinidade e estabilidade de ligação, a região variável 4G7 H1L1 foi escolhida para desenvolvimento adicional. A Figura 15b mostra os resultados de um ensaio CMCA em modelos de imunogenicidade reduzida HD37_H2L1 Híbrido S239D/I332E e 4G7_H1L3 Híbrido S239D/I332E na linha de células MEC-1 (LLC). Este ensaio CMCA foi realizado como nos ensaios anteriores. Ambos os anticorpos são ativos nesta linha de células e portanto e, portanto, podem ser tratamentos potenciais para CLL.

Exemplo 5. Aumento da afinidade e estabilidade da função efetora de anti-CD19 aumentada.

A maturação de afinidade 4G7 mAb H1L1 foi realizada com vista a aumentar adicionalmente a afinidade de ligação CD19 assim como a potência CMCA. A maturação de afinidade foi realizada em três estádios usando uma abordagem de manipulação computacional/proteína. Primeiro, operando sob a hipótese de que os resíduos da determinação de especificidade (SDRs) (Padlan, E.A. et al. 1995. FASEB J. 9: 133-139) nas CDRs de um anticorpo já foram otimizados pelas células B no processo de hipermutação somática *in vivo*, uma biblioteca de variantes 94 foi designado para determinar aqueles resíduos nas CDRs que foram críticos para a ligação a antígeno, e assim não deve ser mudado durante o processo de manipulação. Esta biblioteca consiste de uma ou duas mutações de "sondagem" mutações feitas nas posições nas CDRs com sítios escolhidos usando modelação estrutural assim como a probabilidade de que a posição é frequentemente um SDR, que foi compilado a partir da análise de estruturas complexa antígeno-anticorpo disponíveis no Protein Data Bank (PDB) (MacCallum, R.M. et al. 1996. JMB 262: 732-745; Almagro, J.C. 2004. J. Mol. Recognit. 17:132-143).

Foram introduzidas mutações variantes usando o kit de mutagenese QuikChange no formato Fab do modelo H1L1 e continha uma etiqueta 6X-His. As variantes Fabs foram expressas em células 293T usando placas d 24 poços e foram analisadas por AlphaScreen ou citometria de fluxo usando células Raji ou RS4;11, e com a concentração de cada variante determinada usando um chip de ligação His por Biacore™. Das 50 posições, foram identificadas 17 posições que foram críticas para ligação a antígeno, permitindo-nos reduzir o tamanho da biblioteca na ronda seguinte de maturação de afinidade e dando valiosa informação estrutural sobre quais as posições que ficam junto da interface do antígeno e que fariam bons alvos para

encontrar variantes de afinidade aumentadas. Os 17 SDRs identificados nas nossas análises estão em excelente concordância com o número médio de SDRs presentes nos anticorpos cujos complexos antígeno-anticorpo foram resolvidos (Almagro, J.C. 2004. *J. Mol. Recognit.* 17:132-143). Para além da informação estrutural valiosa ganha com esta biblioteca, foram obtidas algumas variantes que tinham uma afinidade aumentada.

As restantes 33 posições CDR foram classificadas por ordem de importância com base na análise dos resultados da primeira biblioteca e através do mapeamento do SDRs do modelo estrutural do modelo H1L1. Através desta análise determinou-se que praticamente toda a interface de ligação de antígeno-anticorpo pode ser explorada com uma frequência total de 12,2 aminoácidos por posição (~9.3 novas variantes por posição) com uma segunda ronda de tamanho de biblioteca de 279 variantes. A Library Design Automation (LDA™) (US 2006/0234303, registada em 3 de março, 2006) foi usada para criar uma biblioteca de variantes otimizada que foi ajustada para adequação e cobertura com base no número de variantes desejadas. A biblioteca final da segunda ronda quando ajustada para formato de alto rendimento contendo 265 variantes a 30 posições. Esta biblioteca produziu diversas variantes mostrando afinidades de ligação aumentadas. As variantes anti-CD19 Fab foram triadas por citometria de fluxo para determinar a afinidade. A linha de células RS4;11, conhecida por expressar CD19, foi suspensa em PBS e plaqueada a 200.000 células/poço numa placa de 96 poços de fundo redondo. Uma diluição seriada de anticorpos CD19 foi adicionada a células RS4;11 a uma concentração desconhecida. As células foram incubadas sobre gelo durante 30 minutos e depois lavadas 4 vezes em PBS. Um anti-Fab PE-marcado F(ab')₂ foi diluído a 1/50 em PBS, o qual foi

depois usado para resuspender as RS4;11 revestidas com anti-CD 19 Fab. As células foram incubadas durante 30 minutos e lavadas duas vezes. As células foram depois fixadas e os ensaios de ligação foram avaliados num citómetro de fluxo FACS Canto II. O MFI foi usado para medir a força de ligação. A partir das duas bibliotecas um e dois, foi obtido um total de 30 variantes de afinidade únicas em 11 posições.

A análise dos dados de ligação das duas primeiras bibliotecas assim como a análise estrutural adicional permitiu-nos desenhar uma terceira e final biblioteca contendo combinações de 2-8 variantes únicas. Esta biblioteca consistiu de 149 variantes em 8 posições. Destas, 20 variantes mostraram um aumento significativo na afinidade e foram selecionadas para conversão para o formato de comprimento completo para medição simultânea da afinidade de ligação e CMCA. Para avaliar as propriedades da solução, foram realizados ensaios de estabilidade nestas variantes. O conjunto final das mutações incluídas nas 20 finais eram as variantes de cadeia pesada T57P, K58E, S100cT, R100dS, e as variantes de cadeia leve L27cQ, S27eV, A55N, F96I, e F96N. Estudos de estabilidade acelerada revelaram que pelo menos uma das mutações de afinidade aumentada criou instabilidade na proteína e fez com que estas variantes perdessem toda a potência após somente 8 h a 37°C. Tendo em conta os dados de ligação e estabilidade, uma afinidade definitiva do candidato mAb amadurecido pode ser selecionada a qual apresentou um aumento de ~10 vezes de afinidade de ligação nas células RS4;11 relativamente ao H1L1 mAb (Figura 16). As variantes delineadas para aumentarem a estabilidade a longo termo da molécula anti-CD19 foram também desenhadas e triadas. A Figura 17 mostra os dados de ligação para as variantes incubadas durante 5 dias a 37°C, pH 9,0 em 200 mM Tris-LCP, demonstrando a

melhoria na estabilidade obtida a partir de uma variante anti-CD19.

Todas as substituições unitárias feitas para maior estabilidade e/ou afinidade são mostrados na Figura 27. A Figura 28 lista todas as variantes da região variável anti-CD19 construída para otimizar a afinidade e estabilidade. A Figura 29 lista as variantes preferidas e o aumento relativo na afinidade de ligação versus o H1L1 mAb parente. As sequências para as variantes de cadeia pesada de afinidade e/ou estabilidade aumentada preferidas são mostradas na Figura 18. As sequências para as variantes de cadeia leve de afinidade e/ou estabilidade aumentada preferidas são mostradas na Figura 19. Sequências de aminoácidos de variante S239D/I332E Híbrido de comprimento completo contendo as regiões variáveis de afinidade e estabilidade melhorada são fornecidas como SEQ ID NOs: 86-110. As CDR's de afinidade e estabilidade melhorada são fornecidos como SEQ ID NOs: 111-131.

Exemplo 6. Propriedades antiproliferativas de 4G7 Híbrido S239D/I332 em células Raji.

Para observar um efeito antiproliferativo *in vitro*, muitos anticorpos requerem ligação cruzada, usualmente conseguida com um anticorpo secundário. Foi proposto que os efeitos correspondentes *in vivo* destes anticorpos possam estar dependentes da ligação cruzada mediada por recetores Fc expressados na superfície das células efectoras. Nesta experiência as células Raji foram crescidas durante 3 dias na presença de 100 ng/mL 4G7 Híbrido S239D/I332E, 4G7 IgG1, ou anti-CD20 (rituximab) ou anticorpos controlo (não-CD19 ligados à região variável com variantes Fc Híbrido S239D/I332E) a várias concentrações com 10x o excesso molar de anticorpo de ligação cruzada. O crescimento celular foi

medido usando um ensaio de luminescência dependente de ATP. Os resultados para o ensaio de antiproliferação são mostrados na Figura 20. OS dois 4G7 Híbrido S239D/I332E e 4G7 IgG1 mostram mais fortes efeitos antiproliferação que o rituximab.

Exemplo 7. Propriedades antiproliferativas de Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 em células SU-DHL-6.

Nesta experiência as células SU-DHL-6 foram ou crescidas durante 3 dias na presença de 4G7 humanizada e Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas e anticorpos controle a várias concentrações com 10x o excesso molar de anticorpo de ligação cruzada e 6000 células/poço ou foram crescidas na presença de uma concentração do anticorpo fixada a 3000 células/poço e a viabilidade a pontos específicos de tempo medida durante um total de 72 horas. Os resultados do ensaio de antiproliferação são mostrados na Figura 21. A estabilidade e afinidade melhorada para 4G7 do Híbrido S239D/I332E mostra mais forte efeito antiproliferativo que o rituximab. A estabilidade e afinidade melhoradas de 4G7 Híbrido S239D/I332E mostram também efeitos antiproliferativos mesmo na ausência de anticorpo de ligação cruzada.

Exemplo 8. Fagocitose de Raji e células RS4;11 com estabilidade e afinidade melhoradas do Híbrido S239D/I332E paara 4G7.

Ao contrário das células NK as quais expressam somente FcγRIIIa e algumas vezes FcγRIIc, os monócitos e as células efetoras derivadas de monócito expressam uma gama de FcγRs, incluindo FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, e FcγRIIIa. Assim a ativação e função das células efetoras derivadas de

monócitos, incluindo por exemplo macrófagos, podem ser dependentes ou envolver complexos imunológicos de anticorpo com outros recetores que não somente FcγRIIIa. Evidentemente que como descrito na PCT WO 2007/041635, Desjarlais J.R. et al., registada em 3 de outubro, 2006, a fagocitose por macrófagos é mediada em parte por envolvimento do anticorpo com FcγRIIa.

Para avaliar a capacidade de estabilidade e afinidade melhoradas do Híbrido S239D/I332E para 4G7 para mediar a fagocitose a foi realizado um ensaio de fagocitose baseada em citometria de fluxo. Monócitos CD14⁺ purificados foram cultivados em fator de estimulação de colónia de macrófagos (50ng/mL) durante 5 dias numa incubadora humidificada para a diferenciação de macrófagos. As células RS4;11 ou Raji foram usadas como alvo. As células alvo foram marcadas com PKH67 (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram adicionadas a uma placa de 96 poços após às quais foi adicionada uma diluição seriada de anticorpos anti-CD19 modificados em WT e Fc. Macrófagos derivados de monócitos foram depois adicionados aos poços a um efetor para visar uma proporção de 4:1. Estes ensaios foram realizados na presença de soro humano. A cocultura de células foi resumidamente centrifugada e depois incubada numa incubadora humidificada durante 4 horas. As células foram colhidas, e os macrófagos foram corados com uma segunda cor fluorescente para os distinguir dos do alvo. As células foram fixadas em PFA 1% e a fagocitose foi avaliada num Citómetro de fluxo FACS Canto II. A leitura da fagocitose foi determinada pelo número de células positivas duplas divididas pelo número total de células tumorais. Os resultados dos ensaios de fagocitose são mostrados na Figura 22. A estabilidade e afinidade melhoradas de Híbrido S239D/I332E para 4G7 mostra um nível aumentado de

fagocitose em ambas as linhas de células em comparação com o anticorpo IgG1 anti-CD19.

Os macrófagos são fagócitos que atuam como captadores para consumir as células mortas, as substâncias estranhas, e outros detritos. Importante, os macrófagos são células profissionais apresentadoras de antígeno (CAAs), removendo os patógenos e estruturas estranhas dos tecidos periféricos, depois migrando para os órgãos linfóides secundários para iniciar respostas imunológicas adaptativas por ativação das células T naives. Portanto os resultados da experiência anterior sugerem que a modificação dos anticorpos anti-CD19 pode permitir os mecanismos de ação que incluem ambas as funções efetoras citotóxicas inatas, assim como as funções efetoras que podem conduzir potencialmente à resposta imunológica adaptativa a longo prazo.

Exemplo 9. CMCA de estabilidade e afinidade melhoradas de x Híbrido S239D/I332E para 4G7 contra linhas de células de linfoma múltiplo usando células assassinas naturais (NK) purificadas

Com vista a avaliar as propriedades citotóxicas de Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7, foram realizados ensaios CMCA com células NK purificadas num painel de 6 linhas de células representando vários linfomas e leucemias (Figura 23). CMCA com células NK purificadas é feita em placas microtituladoras de 96 poços. As células NK foram purificadas a partir de CMSP humano usando o kit da Miltenyi Biotec (Cat #130-091-152) e incubadas em 10% de FBS/RPMI1640 ao longo da noite com 10 ng/mL de IL-2. No dia seguinte, 10,000 (WaC3CD5, Namalwa, Bonna-12, Ramos) ou 20,000 (RS4;11, BV-173) células de cancro alvo são opsonizadas com concentrações variáveis de

anticorpo e 50k de células NK são usadas para cada concentração de anticorpos em triplicado. As células alvo são lavadas três vezes enquanto as células NK são lavadas duas vezes com RPMI1640 e ambas resuspendidas em 1% de FBS/RPMI1640 e adicionadas às soluções de anticorpo. Após 4 horas de incubação a 37°C numa incubadora humidificada com 5% de CO₂, o ensaio foi quantificado usando sistema de detecção dependente de fluorescência CytoTox-One dependente de LDH da Promega (#PAG7891). O sinal de LDH total é determinado a partir de células alvo lisadas Triton-X100 (LDH Alvo Total) e usado para normalizar valores experimentais ajustados contra a base de LDH espontânea (Base espontânea). Assim a % CMCA = $((\text{Valor Experimental} - \text{Base Espontânea}) / (\text{LDH Alvo Total} - \text{LDH Alvo})) * 100$. A base espontânea é o valor obtido a partir de células Alvo e NK coincubadas na ausência de anticorpo. LDH alvo é o valor das células alvo cancerígenas sozinhas libertando espontaneamente LDH durante a incubação. A Figura 23 mostra os resultados de CMCA, ensaio para 6 linhas de células usando Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7, 4G7 IgG1 (com região variável afinidade/estabilidade otimizada), rituximab (anti-CD20), e um anticorpo isotipo controle. Para todas as linhas de células testadas, Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 tem melhor desempenho na potência e eficácia em comparação com 4G7 IgG1 e rituximab.

Exemplo 10. Híbrido S239D/I332E estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 ligando células 293T transfetadas CD19

Um clone CD19 humano foi encomendado à Origene (No. de catálogo SC127938) e transfetada para células 293T. As células foram suspensas em PBS e plaqueadas a 100 000 células/poço. Uma diluição seriada de 4G7 Híbrido S239D/I3332E de estabilidade e afinidade melhoradas foi

adicionada às células e depois as células foram incubadas em gelo durante 30 minutos e depois lavadas 4 vezes em PBS. Um anti-Fab PE-marcado F(ab')₂ foi diluído 1/50 em PBS, o qual foi depois usado para resuspender as células 293T revestidas com anti-CD19 de Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7. As células foram incubadas durante 30 minutos e lavados duas vezes. As células foram então fixadas e a ligação foi avaliada num citómetro de fluxo FACS Canto II. A Figura 24 mostra os resultados para este teste. Os resultados mostram que Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 ligam as células 293T transfetadas com CD19 e não ligam as células controlo (células 293T normais).

Exemplo 11. 4G7 Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas é de reação cruzada com CD19 de cinomolgos e macacos rhesus.

A testagem pré-clínica de fármacos em macacos é tipicamente um importante passo na descoberta de medicamentos a fim de avaliar a toxicidade potencial. Foram obtidas amostras de sangue de cinco cinomolgos (*Macaca fascicularis*; género = Macaco (Latim) ou Macaco (Português); espécie = *fascicularis*) e cinco macacos rhesus (*Macaca mulatta*). Híbrido S239D/I332E de 4G7 anti-CD19 de estabilidade + afinidade melhorada, IgG1 anti-CD19 (imunogenicidade reduzida, mas sem região variável afinidade/estabilidade otimizada), rituximab (anti-CD20), e controlo negativo (Fc aumentado, região variável não ligada) foram diretamente marcadas com FITC. O Rituximab foi também marcado com CAA para identificar as células da fração de células B. Todas as CMSPs humanas foram usadas como controlos positivos. As amostras de sangue e CMSPs foram pré-incubadas com 2 mg/mL de um isotipo de anticorpo controlo com Fc aumentada para bloquear qualquer potencial ligação FcγR. Em cada

experiência, rituximab-CAA e uma das variantes de teste foram incluídas no ensaio. A detecção é feita usando um Citómetro de fluxo FACS Canto II com frações de linfócitos de porta baseados na dispersão para a frente e lateral. Os resultados são mostrados na Figura 25. Anti-CD19 maduras não afinidade/estabilidade (assim como o seu anticorpo parente de murino) não reage cruzadamente com CD19 de conimolgos ou rhésus. As variantes que aumentam a ligação e estabilidade da molécula anti-CD19 viabilizam a reatividade cruzada de Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 tanto para CD19 de conimolgos como de rhésus.

Exemplos 12. CMCA de um anticorpo anti-CD19 de função efetora melhorada com reduzido conteúdo de fucose

Os anticorpos anti-CDf19 com função efetora melhorada (4G7 H1L1 Híbrido S239D/1332E) foram avaliados com reduzido conteúdo de fucose. A linha de células Lec13 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 49:533-545 (1986)) foi utilizada para expressar anticorpos anti-CD19 com reduzido conteúdo de fucose. Lec13 refere-se a linha de células mutante de Ovário de Hamster Chinês (OHC) resistentes a lectina as quais apresentam um metabolismo da fucose defeituoso e portanto têm uma capacidade diminuída para adicionar fucose ao complexo de hidratos de carbono. Aquela linha de células é descrita em Ripka & Stanley, 1986, Somatic Cell & Molec. Gen. 12(1):51-62; e Ripka et al., 1986, Arch. Biochem. Biophys. 249(2):533-545. Acredita-se que as células Lec13 não têm a transcrição para GDPD-manose-4,6-desidratase, uma enzima chave para o metabolismo da fucose. Ohyama et al., 1988, J. Biol. Chem. 273(23): 14582-14587. A GDP-D-manose-4,6-desidratase gera GDP-mannose-4-ceto-6-D-desoximanose a partir de GDPmanose, a qual é depois convertida pela proteína FX em GDP-L-fucose. A expressão de oligossacáridos

fucosilados está dependente de substratos dadores de GDP-L-fucose e fucosiltransferase(s). A linha de células Lec13 de OHC é deficiente na sua capacidade para adicionar fucose, mas fornece IgG com oligossacárido o qual é por sua vez similar aquele encontrado em linhas de células OHC normais e no soro humano (Jefferis, R. et al., 1990, *Biochem. J.* 268, 529-537; Raju, S. et al., 2000, *Glycobiology* 10, 477-486; Routier, F. H., et al., 1997, *Glycoconj. J.* 14, 201-207). As células OHC e HEK293 normais adicionam fucose ao oligossacárido IgG num elevado grau, tipicamente desde 80-98%, e as IgGs dos seros são também altamente fucosiladas (Jefferis, R. et al., 1990, *Biochem J.* 268, 529-537; Raju, S. et al., 2000, *Glycobiology* 10, 477-486; Routier, F. H., et al., 1997, *Glycoconj. J.* 14, 201-207; Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277(90):26733-26740). Está bem estabelecido que os anticorpos expressos nas células Lec13 transfetadas produzem consistentemente cerca de 10% de hidrato de carbono fucosilado (Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277(90):26733-26740).

Os ensaios de CMCA foram realizados em células RS4;11 e MEC-1 usando anticorpos anti-CD19 com e sem variantes com função efetora melhorada e com e sem fucosilação reduzida. A Figura 26 mostra os resultados destes ensaios CMCA. A potência e a eficácia de CMCA são similares para o anticorpo anti-CD19 com modificações de aminoácido (4G7_H1L1_Hybrid_239D/1332E + fucose) e IgG1 anti-CD19 com reduzido conteúdo de fucose (4G7_H1L1_IgG1_WTfucose). A potência de CMCA é adicionalmente aumentada através da combinação da modificação de aminoácido com reduzido conteúdo de fucose (4G7_H1L1_Hybrid_239D/332E-fucose). (Figura 26). Esta experiência ilustra portanto que podem ser usadas combinações de modificações de aminoácidos e de glicoformas modificadas para otimizar anticorpos anti-CD19 para as propriedades de função efetora.

O uso da linha de células Lec13 não se destina a limitar a presente invenção do modo particular de redução do conteúdo de fucose. Uma diversidade de outros métodos são conhecidos na técnica para controlar o nível de oligossacáridos fucosilados e/ou de bisseção que são ligados covalentemente à região Fc, incluindo mas não limitado a expressão em vários organismos ou linhas de células, manipuladas ou de outra forma (por exemplo células Lec13 OHC ou células YB2/0 de hibridoma de rato), regulação de enzimas envolvidas no passo de glicosilação (por exemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferase] e/ou β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferase III [Gn'TIII]), e modificação de hidrato de carbono(s) de modificação após a IgG ter sido expressa (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; Yamane-Ohnuki et al., 2004, Biotechnology e Bioengineering 87(5):614-621); (US 6,602,684; US 2003/0157108; US 2003/0003097; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1).

O uso de modificações específicas para aumentar a função efetora, por exemplo as substituições 239D e 332E e o reduzido nível de fucose, não se destinam a limitar os anticorpos anti-CD 19 a estas modificações específicas. Como descrito acima na secção intitulada "Modificações para otimizar a função efetora", um grande número de modificações, incluindo modificações de aminoácido e de glicofomas modificadas, está contemplado para os anticorpos anti-CD19 para melhorar as suas propriedades da função efetora.

Exemplo 13. Anticorpos anti-CD19 inibem a proliferação de células B primárias - aplicações de anticorpos anti-CD19 no tratamento de doenças autoimunes

A capacidade dos anticorpos anti-CD19 desta invenção para empobrecerem as células B através de função efetora CMCA é exemplificada pela sua capacidade para lisar uma diversidade de linhas de células representativas de uma gama de linhagem de célula B, como mostrado nos exemplos precedentes. Esta função é mediada por células efetoras tais como células NK e macrófagos que expressam FcγRs, desencadeamento que induz a lise das células alvo revestidas com CD19. Um mecanismo adicional de ação pode também ser mediado contra células B ativadas por antigénio. A ativação por antigénio das células B ser mimetizada pelo uso de anticorpos para recetores de células B (RCB). Isto conduz à sua proliferação na cultura, uma medida genérica de ativação.

A ligação de antigénios pode ser mimetizada *in vitro* por ligação cruzada da RCB (mu ou IgM) com o anticorpo anti-mu (anti-4, anti-IgM). Com vista a demonstrar esta atividade, Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSPs) foram preparadas a partir do Pacote de Leucoforese por gradiente de densidade Ficoll, e as células B primárias humanas foram purificadas a partir das CMSPs usando o kit de seleção magnética negativa comprada na Miltenyi Biotec. O ensaio de proliferação foi realizado em FBS a 10%/meio RPMI1640 num volume total de 100 µL em placas de microtitulação de 96 poços em triplicado. A ativação das células B foi induzida usando fragmento F(ab')₂ de anticorpo anti-mu de cabra (Jackson ImmunoResearch, Inc.). Em 50 µL de meio, diluições seriadas do anticorpo anti-mu foram retiradas alíquotas para placas microtituladoras de 96 poços, às quais foram

adicionadas 83,000 células B purificadas num volume de 50 μ L. Depois as placas microtituladoras foram incubadas a 37°C durante 3 dias após os quais, foi usado o formato de ensaio de luminescência de ATP (Cell TiterGlo Kit da Promega) para detetar as células vivas usando o luminómetro. A Figura 30a mostra que há uma dependência de dose da proliferação das células B na concentração de anticorpo anti-mu.

Com vista a avaliar a capacidade de anticorpos anti-CD19 WT (4G7_H3_L1 IgG1_WT) e variante (4G7_H3_L1_Hybrid_239D/332E) para modular a proliferação das células B, foi realizado um ensaio para monitorizar a viabilidade das células B humanas primárias na presença de anti-CD19 e coestimular o anticorpo anti-mu. Como descrito acima, foram preparadas CMSPs a partir do Pacote de Leucoforese por gradiente de densidade Ficoll, e as células B humanas primárias foram purificadas a partir das CMSPs usando seleção magnética negativa. O ensaio de proliferação foi realizado em FBS a 10%/meio RPMI1640 num volume total de 100 μ L em placas microtituladoras de 96 poços em triplicados. Para induzir a ativação das células B, foi usado o fragmento F(ab')₂ do anticorpo anti-mu de cabra. Em 50 μ L de meio, uma concentração fixa (2 mg/mL) de anti-mu com diluições seriadas cinco vezes dos anticorpos foram realizadas em placas microtituladoras de 96 poços, às quais 100,000 células B purificadas foram adicionadas num volume de 50 μ L. Depois as placas microtituladoras foram incubadas a 37°C durante 3 dias após os quais foi usado um formato de ensaio de luminescência de ATP para detetar as células vivas usando iluminómetro.

Os resultados, fornecidos na Figura 30b, mostram que anticorpo anti-CD 19 WT não tem efeito na proliferação das

células B primárias, similarmente ao controlo negativo com anticorpo anti-CD30 (CD30 não é exposto nas células B). Pelo contrário, o anticorpo anti-CD19 compreendendo modificações Fc tem atividade inibidora significativa contra a viabilidade das células B. Especialmente, uma sinalização *in vitro* como resultado da ligação cruzada anti-mu anticorpo mimetiza o envolvimento de antígeno de RCB, e é um proxy para o envolvimento de RCB pelo autoantígeno numa situação clínica autoimune.

A patogénese da maioria das doenças autoimunes está acoplada à produção de auto-anticorpos contra os próprios antígenos, conduzindo a uma diversidade de patologias associadas. Por exemplo, SLE é caracterizada pela produção de anticorpos auto ou próprios para duplicar a cadeia de ADN. Consequentemente, na experiência acima descrita o envolvimento de RCB *in vitro* por anticorpo anti-mu mimetiza a estimulação das células B em doentes de lúpus *in vivo* por anticorpos anti-cadeia dupla de ADN. Os autoanticorpos são produzidos por células de plasma terminalmente diferenciadas que são derivadas de células B naïves ou memória. Além disso, as células B podem ter outros efeitos na patologia autoimune, como células apresentando antígeno (CAAs) que podem interagir com e estimular células T auxiliares, estimulando mais o ciclo de resposta imune anti próprio. Dada a expressão de CD19 na maioria da linhagem de células B, variando desde pré-B para células plasmáticas, os anticorpos desta invenção pode ter grande utilidade para o tratamento de doenças autoimunes. Exemplos dessas doenças autoimunes incluem, mas não são limitados a, artrite reumatóide (RA), sistema de lúpus eritematóide (SLE ou lúpus), esclerose múltipla, Síndrome de Sjogren, e púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

O exemplo corrente demonstra que os anticorpos anti-CD19 da invenção podem inibir substancialmente a proliferação das células B num modo dependente de dose, indicando que podem inibir a ativação das células B estimuladas por antigénio. A ativação das células B pelo antigénio pode também iniciar o processo de comutação de classe e, em última análise, a diferenciação terminal em células plasmáticas secretoras de anticorpos. Os anticorpos desta invenção são portanto capazes de inibirem estes processos através de um mecanismo adicional de ação que não requer células efetoras. É esperado que esta inibição tenha impacto benéfico na doença autoimune impedindo a diferenciação terminal das populações de células B naives e de memória, prevenindo assim a diferenciação das células plasmáticas secretoras de auto-anticorpos. Também é possível que aspetos adicionais da biologia das células B tais como apresentação de antigénio seja afetada pelos anticorpos anti-CD19.

> IgG1 G1m(a,2) allotype (SEQ ID NO:80)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHFDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG1 G1m(a,2) allotype (SEQ ID NO:81)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG1 G1m(f) allotype (SEQ ID NO:82)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG1 G1m(a,f) allotype (SEQ ID NO:83)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG2 G2m(n+) allotype (SEQ ID NO:84)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG2 G2m(n-) allotype (SEQ ID NO:85)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

> 4G7 H1 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:86)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGSRVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.52 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:87)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.78 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:88)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NAGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGSRVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.191 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:89)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NDGTEYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.192 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:90)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NDGPKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.196 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:91)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NDGPKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTSVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.201 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:92)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NSGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.202 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:93)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NEGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNIHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.203 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:94)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NSGTEYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.204 Hybrid S239D/I332E (SEQ ID NO:95)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NEGTEYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPFDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 L1 (SEQ ID NO:96)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNLSNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYRM
 SNLASGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.26 (SEQ ID NO:97)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYR
 MSN LASGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.32 (SEQ ID NO:98)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNLSNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYR
 MSN LASGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.64 (SEQ ID NO:99)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNLSNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYRM
 SNLASGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.68 (SEQ ID NO:100)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM
 SNLASGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7.L1.96 (SEQ ID NO:101)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM
 SNLNSGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.145 (SEQ ID NO:102)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLASGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.148 (SEQ ID NO:103)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.149 (SEQ ID NO:104)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.154 (SEQ ID NO:105)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.155 (SEQ ID NO:106)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.160 (SEQ ID NO:107)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNANTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.162 (SEQ ID NO:108)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNaNANTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.163 (SEQ ID NO:109)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNaNSNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.164 (SEQ ID NO:110)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNaNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 VH CDR2 D55A (SEQ ID) NO:111)

YINPYNAGTKYNEKFKG

> 4G7 VH CDR2 T57P (SEQ ID NO:112)

YINPYNDGPKYNEKFKG

> 4G7 VH CDR2 K58E (SEQ ID NO:113)

YINPYNDGTEYNEKFKG

> **4G7 VH CDR2 D55S (SEQ ID NO:114)**

YINPYNSGTKYNEKFKG

> **4G7 VH CDR2 D55E (SEQ ID NO:115)**

YINPYNEGTKYNEKFKG

> **4G7 VH CDR3 S100T (SEQ ID NO:116)**

GTYYYGTRVFDY

> **4G7 VH CDR13 R100ds (SEQ ID NO:117)**

GTYYYGSSVFDY

> **4G7 VH CDR3 S100cT/R100ds (SEQ ID NO:118)**

GTYYYGTSVFDY

> **4G7 VL CDR1 L27cQ (SEQ ID NO:119)**

RSSKSLQNSNGNTYLY

> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eV (SEQ ID NO:120)**

RSSKSLQNVNGNTYLY

> **4G7 VL CDR1 S27cV (SEQ ID NO:121)**

RSSKSLNVNGNTYLY

> **4G7 VL CDR1G29A (SEQ ID NO: 122)**

RSSKSLNSNANTYLY

> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eV/G29A (SEQ ID NO:123)**

RSSKSLQNVNANTYLY

> **4G7 VL CDR1 S27eA (SEQ ID NO:124)**

RSSKSLNANGNTYLY

> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eA/G29A (SEQ ID NO:125)**

RSSKSLQNANANTYLY

> **4G7 VL CDR1 G29S (SEQ ID NO:126)**

RSSKSLNSNSNTYLY

> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eA/G29S (SEQ ID NO:127)**

RSSKSLQNANSNTYLY

> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eA (SEQ ID NO:128)**

RSSKSLQNANGNTYLY

> **4G7 VL CDR2 A55N (SEQ ID NO:129)**

RMSNLNS

> **4G7 VL CDR3 F96I (SEQ ID NO:130)**

MQHLEYPIT

> **4G7 VL CDR3 F96N (SEQ ID NO:131)**

MQHLEYPNT

> **4G7 VH CDR1 (SEQ ID NO:132): SYVMH**

> **4G7 VH CDR2 (SEQ ID NO:133): YINPYNDGTYNEKFKG**

> **4G7 VH CDR3 (SEQ ID NO:134): GTYYYGSRVFDY**

> **4G7 VL CDR1 (SEQ ID NO:135): RSSKSLNLSNGNTYLY**

> **4G7 VL CDR2 (SEQ ID NO:136): RMSNLAS**

> **4G7 VL CDR3 (SEQ ID NO:137): MQHLEYPFT**

> **HD37 VH CDR1 (SEQ ID NO:138): SYWMN**

> **HD37 VH CDR2 (SEQ ID NO:139): QIWPGDGDNTYNGKFKG**

> **HD37 VH CDR3 (SEQ ID NO:140): RETTTVGRYYYAMDY**

> **HD37 VL CDR1 (SEQ ID NO:141): KASQSVDYDGDSYLN**

> **HD37 VL CDR2 (SEQ ID NO:142): DASNLVS**

> **HD37 VL CDR3 (SEQ ID NO:143): QQSTEDPWT**

Além disso, a presente descrição relaciona-se com os seguintes itens:

1. Um anticorpo que se liga a CD19, o referido anticorpo compreendendo a cadeia pesada e/ou a cadeia leve, a referida cadeia pesada com uma CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NO: 132 e 138, a CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOs:111-115 e a CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionadaa partir do grupo que consiste das SEQ ID NOs:116-118; e a referida cadeia leve com uma CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 119-128, a CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NOs:129, e a CDR3 compreendendo uma sequência de

aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS:130-131.

2. Um anticorpo de acordo com o item 1, em que o referido anticorpo compreende uma sequência variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS: 13-16, 20-23, e 27-44, e/ou uma sequência de cadeia leve variável selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS: 17-19, 24-26, e 45-79.

3. Um anticorpo de acordo com o item 2, em que o referido anticorpo compreende uma sequência variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS: 86-95, e/ou uma sequência de cadeia leve variável selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS: 96-110.

4. Um anticorpo de acordo com o item 1, em que o referido anticorpo se liga com afinidade aumentada ao Recetor de FcγRIIIa ou aumenta função efetora CMCA em comparação com o anticorpo parente.

5. Um anticorpo de acordo com o item 4, em que a referida modificação é um aminoácido.

6. O anticorpo de acordo com o item 5, em que a referida modificação de aminoácido é numa posição selecionada a partir do grupo que consiste de 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326,

327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, e 337, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

7. Um anticorpo de acordo com o item 5, em que a referida modificação de aminoácido é uma substituição selecionada a partir do grupo que consiste de 221 K, 221 Y, 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 227E, 227G, 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A, 233D, 233F, 233G, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233Y, 234A, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234Y, 235A, 235D, 235E, 235F, 235G, 235H, 235L, 235K, 235M, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V, 235W, 235Y, 236A, 236D, 236E, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236N, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 237D, 237E, 237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237N, 237P, 237Q, 237R, 237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F, 238G, 238H, 238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S, 238T, 238V, 238W, 238Y, 239D, 239E, 239F, 239G, 239H, 239I, 239K, 239L, 239M, 239N, 239P, 239Q, 239R, 239T, 239V, 239W, 239Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 241D, 241E, 241L, 241R, 241S, 241W, 241Y, 243E, 243H, 243L, 243Q, 243R, 243W, 243Y, 244H, 245A, 246D, 246E, 246H, 246Y, 247G, 247V, 249H, 249Q, 249Y, 255E, 255Y, 258H, 258S, 258Y, 260D, 260E, 260H, 260Y, 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263A, 263I, 263M, 263T, 264A, 264D, 264E, 264F, 264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N, 264P, 264Q, 264R, 264S, 264T, 264W, 264Y, 265F, 265G, 265H, 265I, 265K, 265L, 265M, 265N, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T, 265V, 265W, 265Y, 266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F, 267H, 267I, 267K, 267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267T, 267V, 267W, 267Y, 268D, 268E, 268F, 268G, 268I, 268K, 268L, 268M, 268P, 268Q, 268R, 268T, 268V, 268W, 269F, 269G, 269H, 269I, 269K, 269L, 269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T, 269V, 269W, 269Y, 270F, 270G, 270H, 270I, 270L, 270M, 270P, 270Q, 270R, 270S,

270T, 270W, 270Y, 271A, 271D, 271E, 271F, 271G, 271H, 271I,
271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271S, 271T, 271V, 271W,
271Y, 272D, 272F, 272G, 272H, 272I, 272K, 272L, 272M, 272P,
272R, 272S, 272T, 272V, 272W, 272Y, 273I, 274D, 274E, 274F,
274G, 274H, 274I, 274L, 274M, 274N, 274P, 274R, 274T, 274V,
274W, 274Y, 275L, 275W, 276D, 276E, 276F, 276G, 276H, 276I,
276L, 276M, 276P, 276R, 276S, 276T, 276V, 276W, 276Y, 278D,
278E, 278G, 278H, 278I, 278K, 278L, 278M, 278N, 278P, 278Q,
278R, 278S, 278T, 278V, 278W, 280G, 280K, 280L, 280P, 280W,
281D, 281 E, 281K, 281N, 281P, 281Q, 281 Y, 282E, 282G,
282K, 282P, 282Y, 283G, 283H, 283K, 283L, 283P, 283R, 283Y,
284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 285D, 285E, 285K,
285Q, 285W, 285Y, 286E, 286G, 286P, 286Y, 288D, 288E, 288Y,
290D, 290H, 290L, 290N, 290W, 291D, 291E, 291G, 291H, 291I,
291Q, 291T, 292D, 292E, 292T, 292Y, 293F, 293G, 293H, 293I,
293L, 293M, 293N, 293P, 293R, 293S, 293T, 293V, 293W, 293Y,
294F, 294G, 294H, 294I, 294K, 294L, 294M, 294P, 294R, 294S,
294T, 294V, 294W, 294Y, 295D, 295E, 295F, 295G, 295H, 295I,
295M, 295N, 295P, 295R, 295S, 295T, 295V, 295W, 295Y, 296A,
296D, 296E, 296G, 296H, 296I, 296K, 296L, 296M, 296N, 296Q,
296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F, 297G, 297H, 297I,
297K, 297L, 297M, 297P, 297Q, 297R, 297S, 297T, 297V, 297W,
297Y, 298A, 298D, 298E, 298F, 298H, 298I, 298K, 298M, 298N,
298Q, 298R, 298T, 298W, 298Y, 299A, 299D, 299E, 299F, 299G,
299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299K, 299S,
299V, 299W, 299Y, 300A, 300D, 300E, 300G, 300H, 300K, 300M,
300N, 300P, 300Q, 300R, 300S, 300T, 300V, 300W, 301D, 301E,
301H, 301Y, 302I, 303D, 303E, 303Y, 304D, 304H, 304L, 304N,
304T, 305E, 305T, 305Y, 313F, 317E, 317Q, 318H, 318L, 318Q,
318R, 318Y, 320D, 320F, 320G, 320H, 320I, 320L, 320N, 320P,
320S, 320T, 320V, 320W, 320Y, 322D, 322F, 322G, 322H, 322I,
322P, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y, 323I, 324D, 324F, 324G,
324H, 324I, 324L, 324M, 324P, 324R, 324T, 324V, 324W, 324Y,
325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K, 325L, 325M,
325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325Y, 326E, 326I,

326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 327I, 327K, 327L, 327M, 327N, 327P, 327R, 327S, 327T, 327V, 327W, 327Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328I, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D, 329E, 329F, 329G, 329H, 329I, 329K, 329L, 329M, 329N, 329Q, 329R, 329S, 329T, 329V, 329W, 329Y, 330E, 330F, 330G, 330H, 330I, 330L, 330M, 330N, 330P, 330R, 330S, 330T, 330V, 330W, 330Y, 331D, 331F, 331H, 331I, 331L, 331M, 331Q, 331R, 331T, 331V, 331W, 331Y, 332A, 332D, 332E, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332N, 332P, 332Q, 332R, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 333A, 333F, 333H, 333I, 333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334A, 334F, 334I, 334L, 334P, 334T, 335D, 335F, 335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335N, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337E, 337H, e 337N, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

8. Um anticorpo de acordo com o item 5, em que a referida modificação de aminoácido é numa posição selecionada a partir do grupo que consiste de 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, e 337.

9. Um anticorpo de acordo com o item 5, em que a referida modificação de aminoácido é uma substituição selecionada a partir do grupo que consiste de 221K, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225W, 227E, 227G, 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A, 233F, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233Y, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P,

234Q, 234R, 234S, 234T, 234W, 234Y, 235D, 235F, 235G, 235H,
235I, 235K, 235M, 235N, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V, 235W,
235Y, 236D, 236F, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236N,
236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 237D, 237E,
237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237N, 237P, 237Q, 237R,
237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F, 238G, 238H,
238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S, 238T, 238V,
238W, 238Y, 239D, 239E, 239F, 239G, 239H, 239I, 239K, 239L,
239M, 239N, 239P, 239Q, 239R, 239T, 239V, 239W, 239Y, 240M,
240T, 241D, 241E, 241R, 241S, 241W, 241Y, 243E, 243H, 243Q,
243R, 243W, 243Y, 245A, 246D, 246H, 245Y, 247G, 247V, 249H,
249Q, 249Y, 255E, 255Y, 258H, 258S, 258Y, 260D, 260E, 260H,
260Y, 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263A, 263I, 263M, 263T,
264D, 264E, 264F, 264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N,
264P, 264Q, 264R, 264S, 264T, 264W, 264Y, 265F, 265G, 265H,
265I, 265K, 265L, 265M, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T, 265V,
265W, 265Y, 266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F, 267H,
267I, 267K, 267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267V, 267W,
267Y, 268F, 268G, 268I; 268M, 268P, 268T, 268V, 268W, 269F,
269G, 269H, 269I, 269L, 269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T,
269V, 269W, 269Y, 270F, 270G, 270H, 270I, 270L, 270M, 270P,
270Q, 270R, 270S, 270T, 270W, 270Y, 271A, 271D, 271E, 271F,
271G, 271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271
S, 277T, 271V, 271W, 271Y, 272F, 272G, 272H, 272I, 272K,
272L, 272M, 272P, 272R, 272S, 272T, 272V, 272W, 272Y, 274D,
274E, 274F, 274G, 274H, 274I, 274L, 274M, 274P, 274R, 274T,
274V, 274W, 274Y, 275W, 276D, 276E, 276F, 276G, 276H, 276I,
276L, 276M, 276P, 276R, 276S, 276T, 276V, 276W, 278D, 278E,
278G, 278H, 278I, 278K, 278L, 278M, 278N, 278P, 278Q, 278R,
278S, 278T, 278V, 278W, 280G, 280P, 280W, 281E, 281K, 281N,
281P, 281Y, 282G, 282P, 282Y, 283G, 283H, 283K, 283L, 283P,
283R, 283Y, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 285K, 285Q, 285W,
285Y, 286G, 286P, 286Y, 288Y, 290H, 290L, 290W, 291D, 291E,
291G, 291H, 291T, 291Q, 291T, 292D, 292E, 292T, 292Y, 293F,
293G, 293H, 293I, 293L, 293M, 293N, 293P, 293R, 293S, 293T,

293W, 293Y, 294F, 294G, 294H, 294I, 294K, 294L, 294M, 294P, 294R, 294S, 294T, 294V, 294W, 294Y, 295D, 295F, 295G, 295H, 295I, 295M, 295N, 295P, 295R, 295S, 295T, 295V, 295W, 295Y, 296A, 296D, 296E, 296G, 296I, 296K, 296L, 296M, 296N, 296Q, 296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F, 297G, 297H, 297I, 297K, 297L, 297M, 297P, 297R, 297S, 297T, 297V, 297W, 297Y, 298E, 298F, 298H, 298I, 298K, 298M, 298Q, 298R, 298W, 298Y, 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W, 299Y, 300A, 300D, 300E, 300G, 300H, 300K, 300M, 300N, 300P, 300Q, 300R, 300S, 300T, 300V, 300W, 301D, 301E, 301Y, 302I, 303D, 303E, 303Y, 304H, 304L, 304N, 304T, 305E, 305T, 305Y, 313F, 317E, 317Q, 318H, 318L, 318Q, 318R, 318Y, 320D, 320F, 320G, 320H, 320I, 320L, 320N, 320P, 320S, 320T, 320V, 320W, 320Y, 322D, 322F, 322G, 322H, 322I, 322P, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y, 324D, 324F, 324G, 324H, 324I, 324L, 324M, 324P, 324R, 324T, 324V, 324W, 324Y, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K, 325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325Y, 326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 327I, 327Y, 327L, 327M, 327P, 327R, 327V, 327W, 327Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D, 329E, 329F, 329G, 329H, 329I, 329K, 329L, 329M, 329N, 329Q, 329R, 329S, 329T, 329V, 329W, 329Y, 330E, 330F, 330H, 330I, 330L, 330M, 330N, 330P, 330W, 330Y, 331D, 331F, 331H, 331I, 331L, 331M, 331Q, 331R, 331T, 331V, 331W, 331Y, 332A, 332F, 332H, 332L, 332M, 332N, 332P, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 333F, 333H, 333I, 333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334F, 334P, 334T, 335D, 335F, 335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337H, e 337N.

10. O anticorpo do item 5, em que a referida modificação é numa posição selecionada a partir do grupo que consiste de 221, 222, 223, 224, 225, 228, 230, 231, 232, 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 299, 302,

304, 313, 323, 325, 328, 332, 336, em que a numeração de posicionamento é de acordo com o índice EU.

11. O anticorpo do item 5, em que a referida modificação é selecionada a partir do grupo que consiste de 221K, 221Y, 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 244H, 245A, 247G, 247V, 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263A, 263I, 263M, 263T, 266A, 266I, 266M, 266T, 271A, 271D, 271E, 271F, 271G, 271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271S, 271T, 271V, 271W, 271Y, 273I, 275L, 275W, 281D, 281E, 281K, 281N, 281P, 281Q, 281Y, 284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 291D, 293E, 291G, 291H, 291I, 291Q, 291T, 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W, 299Y, 304D, 304H, 304L, 304N, 304T, 313F, 323I, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K, 325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328I, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 332A, 332D, 332E, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332N, 332P, 332Q, 332R, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 336E, 336K, e 336Y.

12. Um anticorpo de acordo com o item 10, compreendendo adicionalmente uma segunda modificação de aminoácido que é numa posição selecionada a partir do grupo que consiste de 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237; 238. 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269; 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333,

334, 335, 336, e 337, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

13. Um anticorpo de acordo com o item 10, em que a referida segunda modificação de aminoácido é a substituição selecionada a partir do grupo que consiste de 221K, 221Y, 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 227E, 227G, 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A, 233D, 233F, 233G, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233Y, 234A, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234Y, 235A, 235D, 235E, 235F, 235G, 235H, 235I, 235K, 235M, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V, 235W, 235Y, 236A, 236D, 236E, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236N, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 237D, 237E, 237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237N, 237P, 237Q, 237R, 237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F, 238G, 238H, 238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S, 238T, 238V, 238W, 238Y, 239D, 239E, 239F, 239G, 239H, 239I, 239K, 239L, 239M, 239N, 239P, 239Q, 239R, 239T, 239V, 239W, 239Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 241D, 241E, 241L, 241R, 241S, 241W, 241Y, 243E, 243H, 243L, 243Q, 243R, 243W, 243Y, 244H, 245A, 246D, 246E, 246H, 246Y, 247G, 247V, 249H, 249Q, 249Y, 255E, 255Y, 258H, 258S, 258Y, 260D, 260I, 260H, 260Y, 262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263 A, 263I, 263M, 263T, 264A, 264D, 264E, 264F, 264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N, 264P, 264Q, 264R, 264S, 264T, 264W, 264Y, 265F, 265G, 265H, 265I, 265K, 265L, 265M, 265N, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T, 265V, 265W, 265Y, 266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F, 267H, 267I, 267K, 267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267T, 267V, 267W, 267Y, 268D, 268E, 268F, 268G, 268I, 268K, 268L, 268M, 268P, 268Q, 268R, 268T, 268V, 268W, 269F, 269G, 269H, 269I, 269K, 269L, 269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T, 269V, 269W, 269Y, 270F, 270G, 270H, 270I, 270L, 270M,

270P, 270Q, 270R, 270S, 270T, 270W, 270Y, 271A, 271D, 271E,
 271F, 271G, 271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R,
 271S, 271T, 271V, 271W, 271Y, 272D, 272F, 272G, 272H, 272I,
 272K, 272L, 272M, 272P, 272R, 272S, 272T, 272V, 272W, 272Y,
 273I, 274D, 274E, 274F, 274G, 274H, 274T, 274L, 274M, 274N,
 274P, 274R, 274T, 274V, 274W, 274Y, 275L, 275W, 276D, 276E,
 276F, 276G, 276H, 276I, 276L, 276M, 276P, 276R, 276S, 276T,
 276V, 276W, 276Y, 278D, 278E, 278G, 278H, 278I, 278K, 278L,
 278M, 278N, 278P, 278Q, 278R, 278S, 278T, 278V, 278W, 280G,
 280K, 280L, 280P, 280W, 281D, 281E, 281K, 281N, 281P, 281Q,
 281Y, 282E, 282G, 282K, 282P, 282Y, 283G, 283H, 283K, 283L,
 283P, 283R, 283Y, 284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y,
 285D, 285E, 285K, 285Q, 285W, 285Y, 286E, 286G, 286P, 286Y,
 288D, 288E, 288Y, 290D, 290H, 290L, 290N, 290W, 291D, 291E,
 291G, 291H, 291I, 291Q, 291T, 292D, 292E, 292T, 292Y, 293F,
 293G, 293H, 293I, 293L, 293M, 293N, 293P, 293R, 293S, 293T,
 293V, 293W, 293Y, 294F, 294G, 294H, 294I, 294K, 294L, 294M,
 294P, 294R, 294S, 294T, 294V, 294W, 294Y, 295D, 295E, 295F,
 295G, 295H, 295I, 295M, 295N, 295P, 295R, 295S, 295T, 295V,
 295W, 295Y, 296A, 296D, 296E, 296G, 296H, 296I, 296K, 296L,
 296M, 296N, 296Q, 296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F,
 297G, 297H, 297I, 297K, 297L, 297M, 297P, 297Q, 297R, 297S,
 297T, 297V, 297W, 297Y, 298A, 298D, 298E, 298F, 298H, 298I,
 298K, 298M, 298N, 298Q, 298R, 298T, 298W, 298Y, 299A, 299D,
 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P,
 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W, 299Y, 300A, 300D, 300E, 300G,
 300H, 300K, 300M, 300N, 300P, 300Q, 300R, 300S, 300T, 300V,
 300W, 301D, 301E, 301H, 301Y, 302I, 303D, 303E, 303Y,
 304D, 304H, 304L, 304N, 304T, 305E, 305T, 305Y, 313F, 317E,
 317Q, 318H, 318L, 318Q, 318R, 318Y, 320D, 320F, 320G, 320H,
 320I, 320L, 320N, 320P, 320S, 320T, 320V, 320W, 320Y, 322D,
 322F, 322G, 322H, 322I, 322P, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y,
 323I, 324D, 324F, 324G, 324H, 324I, 324L, 324M, 324P, 324R,
 324T, 324V, 324W, 324Y, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H,
 325I, 325K, 325L, 325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V,

325W, 325Y, 326E, 326I, 326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 327I, 327K, 327L, 327M, 327N, 327P, 327R, 327S, 327T, 327V, 327W, 327Y, 328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328I, 328K, 328M, 328N, 328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D, 329E, 329F, 329G, 329H, 329I, 329K, 329L, 329M, 329N, 329Q, 329R, 329S, 329T, 329V, 329W, 329Y, 330E, 330F, 330G, 330H, 330I, 330L, 330M, 330N, 330P, 330R, 330S, 330T, 330V, 330W, 330Y, 331D, 331F, 331H, 331I, 331L, 331M, 331Q, 331R, 331T, 331V, 331W, 331Y, 332A, 332D, 332E, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332N, 332P, 332Q, 332R, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 333A, 333F, 333H, 333I, 333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334A, 334F, 334I, 334L, 334P, 334T, 335D, 335F, 335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335N, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337E, 337H, e 337N, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

14. Um anticorpo de acordo com o item 5, em que a modificação aminoácido é 332E.

15. Um anticorpo de acordo com o item 14, compreendendo adicionalmente uma segunda modificação de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste de: 236A, 239D, 332E, 268D, 268E, 330Y, e 330L.

16. Um anticorpo de acordo com o item 15, em que a segunda modificação aminoácido é 239D.

17. Um anticorpo de acordo com o item 4, em que a referida modificação é uma modificação de glicoforma que reduz o nível de fucose em relação ao anticorpo parente.

18. Uma composição compreendendo a pluralidade dos anticorpos glicosilados, em que cerca de 80-100% de anticorpo glicosilado na composição compreende a estrutura

de hidrato de carbono de núcleo maduro que não possui fucose.

19. Um anticorpo de acordo com o item 1, em que o referido anticorpo reduz adicionalmente a ligação a FcγRIIb em comparação com o referido anticorpo anti-CD 19 parente.

20. Uma sequência de ácido nucleico que codifica um anticorpo de um dos itens 1-17.

21. Um método para tratar uma doença relacionada com as células B, em que o referido método compreende a administração de um anticorpo de acordo com o item 1.

22. Um método do item 21, em que a referida doença é selecionada a partir do grupo que consiste de: linfomas não Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLC), célula B leucemia linfoblástica aguda/linfoma (B-LLA), e células de linfoma do manto (LCM).

23. Um método do item 21, em que a referida doença é uma doença autoimune.

24. O método do item 23, em que a referida doença autoimune é selecionada a partir do grupo que consiste de: artrite reumatóide (RA), sistema de lúpus eritematóide (SLE ou lúpus), esclerose múltipla, Síndrome de Sjogren, e púrpura trombocitopénia idiopática (PTI).

25. Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de acordo com o item 1 e um transportador farmaceuticamente aceitável.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> XENCOR, INC.
<120> ANTICORPOS OTIMIZADOS QUE VISAM CD 19
<130> T2329 EP/1 S3
<140> PCT/US2007/075932
<141> 2007-08-14
<150> US 60/822,362
<151> 2006-08-14
<160> 146
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 556
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
 1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
 20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
 35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
 65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
 85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
 100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
 115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
 130 135 140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
145 150 155 160

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
165 170 175

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
180 185 190

Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
195 200 205

Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
210 215 220

Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
225 230 235 240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
245 250 255

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
260 265 270

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
275 280 285

Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
290 295 300

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
325 330 335

Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
340 345 350

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
355 360 365

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
370 375 380

Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly

385		390		395		400									
Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Glu	Gly	Tyr	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Glu	Glu
				405					410					415	
Asp	Ser	Glu	Phe	Tyr	Glu	Asn	Asp	Ser	Asn	Leu	Gly	Gln	Asp	Gln	Leu
			420					425					430		
Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	Gly	Tyr	Glu	Asn	Pro	Glu	Asp	Glu	Pro	Leu	Gly
		435					440					445			
Pro	Glu	Asp	Glu	Asp	Ser	Phe	Ser	Asn	Ala	Glu	Ser	Tyr	Glu	Asn	Glu
	450					455					460				
Asp	Glu	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Val	Ala	Arg	Thr	Met	Asp	Phe	Leu	Ser
465					470					475					480
Pro	His	Gly	Ser	Ala	Trp	Asp	Pro	Ser	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly
				485					490					495	
Ser	Gln	Ser	Tyr	Glu	Asp	Met	Arg	Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Ala	Pro	Gln
			500					505					510		
Leu	Arg	Ser	Ile	Arg	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Asn	His	Glu	Glu	Asp	Ala ¹
		515					520					525			
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asn	Met	Asp	Asn	Pro	Asp	Gly	Pro	Asp	Pro	Ala	Trp ²
	530					535					540				
Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Gly	Thr	Trp	Ser	Thr	Arg				¹
545					550					555					

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> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

200

145					150						155				160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325					330						

<210> 4

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
				165					170					175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
			180					185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
		195					200					205			
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230					235					240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
				245					250					255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
			260					265					270		

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 5

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	
1				5					10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	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	Gln	Thr	
65					70				75						80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
			85					90						95		
Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
			100					105					110			
Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	
		115					120					125				
Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	
	130					135						140				
Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	
145					150					155					160	

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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 Ser 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

225 230 235 240

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 7

$\langle 211 \rangle$ 330

<212> PRT

<213> Sequência artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Constante híbrida de cadeia pesada(CH)

<400> 7

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

Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<211> 330

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Constante de cadeia pesada híbrida (CH) com substituições 239D e 332E

<400> 8

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

213

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

215

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 11

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

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

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

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

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
 85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> H1 4G7

<400> 13

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> H2 4G7

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> H3 4G7

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> H4 4G7

<400> 16

220

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

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

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

Ser Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> L1 4G7

<400> 17

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> L2 4G7

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

--Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> L3 4G7

<400> 19

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
			20					25					30		

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
	35						40					45			

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
65					70					75					80

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
				85					90					95	

Leu	Glu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> H1 HD37

<400> 20

223

Thr Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> H2 HD37

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> H3 HD37

<400> 22

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Ala Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> H4 HD37

<400> 23

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

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

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

Ala Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

<211> 111

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> L1 HD37

<400> 24

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

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

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
 85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 25

<211> 111

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> L2 HD37

<400> 25

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

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

Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			

Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro
	50					55					60				

Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn
65					70					75					80

Ser	Leu	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	His	Cys	Gln	Gln	Ser	Thr
				85					90					95	

Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110	

<210> 26

<211> 111

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> L3 HD37

<400> 26

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
 85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 27

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.109

<400> 27

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 28

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.113

<400> 28

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.144

<400> 29

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

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

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

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

231

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asn Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.146

<400> 30

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe His Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

210> 31

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.147

<400> 31

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

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

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

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

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	

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

Ala	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	115						120	

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Ser Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.191

<400> 32

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.192

<400> 33

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.196

<400> 34

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.199

<400> 35

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.201

<400> 36

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> 4G7 H1.202

<400> 37

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 38
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> 4G7 H1.203
 <400> 38

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.204

<400> 39

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

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

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

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

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

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

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	115						120	

<210> 40

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.52

<400> 40

240

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.60

<400> 41

241

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.62

<400> 42

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.65

<400> 43

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.78

<400> 44

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.11

<400> 45

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Asn Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.124

<400> 46

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Trp Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 47

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.138

<400> 47

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Val
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.139

<400> 48

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Val
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 49

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.141

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.143

<400> 50

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.144

<400> 51

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.145

<400> 52

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 53

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.146

<400> 53

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Val
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 54

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.148

<400> 54

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.149

<400> 55

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.152

<400> 56

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 57

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.154

<400> 57

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 58

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.155

<400> 58

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 59

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.160

<400> 59

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val
 20 25 30

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.161

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val
 20 25 30

Asn Ser Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 61

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.162

<400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ala
 20 25 30

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

<210> 62
<211> 112
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<400> 62

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ala
20 25 30

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 63
<211> 112
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> 4G7 L1.164

<400> 63

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ala
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.17

<400> 64

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.19

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Tyr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.26

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 67

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.3

<400> 67

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Gln Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 68

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.32

<400> 68

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Val
			20					25					30		

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
	35						40					45			

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

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

Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
				85					90					95	

Leu	Glu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 69

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.46

<400> 69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 70

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.54

<400> 70

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Gly Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 71

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.55

<400> 71

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 72

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.64

<400> 72

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 73

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.67

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.68

<400> 74

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

--Glu--Arg--Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.8

<400> 75

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Lys Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.80

<400> 76

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Phe Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 77

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.9

<400> 77

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Leu Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 78

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.92

<400> 78

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Leu Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 79

<211> 112

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.96

<400> 79

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 80

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

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

Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 81

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

245

250

255

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 82

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 83

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1		5						10					15			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	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	Gln	Thr	
65					70				75						80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
			85						90					95		
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
			100					105					110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
		115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
	130					135					140					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
145					150					155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165					170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
			180					185					190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
225					230					235					240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
			245						250					255		

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 84

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

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

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

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

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

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 85

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

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

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

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

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

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 86

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1 Híbrido S239D/I332E

<400> 86

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 87

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.52 Híbrido S239D/I332E

<400> 87

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 88

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.78 Híbrido S239D/I332E

<400> 88

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
 290 295 300

Arg Val-Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 89

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.191 Híbrido S239D/I332E

<400> 89

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 90

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.192 Híbrido S239D/I332E

<400> 90

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 91

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.196 Híbrido S239D/I332E

<400> 91

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 92

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.201 Híbrido S239D/I332E

<400> 92

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 93

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.202 Híbrido S239D/I332E

<400> 93

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 94

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.203 Híbrido S239D/I332E

<400> 94

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

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 95

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 H1.204 Híbrido S239D/I332E

<400> 95

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 ---435 --- 440 --- 445

Pro Gly Lys
450

<210> 96
<211> 219
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> 4G7 L1

<400> 96

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
          20           25           30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
        50           55           60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
          85           90           95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        100          105          110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115          120          125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
        130          135          140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175

--Thr Tyr Ser Leu Ser-Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
        180          185          190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195          200          205

          Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                210          215

<210> 97
<211> 219
<212> PRT
<213> Sequência artificial

```

<220>

<223> 4G7 L1.26

<400> 97

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser
          20           25           30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
          85           90           95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          115          120          125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          130          135          140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          180          185          190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          195          200          205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

<210> 98
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> 4G7 L1.32

<400> 98

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Val
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

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

<210> 99

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.64

<400> 99


```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
          20           25           30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
          85           90           95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          115          120          125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          130          135          140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          180          185          190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          195          200          205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

<210> 100

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.68

<400> 100

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
			20					25					30		

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
	35						40					45			

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

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

Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
				85					90					95	

Leu	Glu	Tyr	Pro	Asn	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
		115					120					125			

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 101

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.96

<400> 101

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

<210> 102
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> 4G7 L1.145

<400> 102

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

				85						90					95
Leu	Glu	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
		115					120						125		
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
	130					135					140				
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145					150					155					160
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165					170					175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180					185					190		
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
	210					215									

<210> 103

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.148

<400> 103

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser
          20           25           30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
          50           55           60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
          85           90           95

Leu Glu Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          115          120          125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          130          135          140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          145          150          155          160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          180          185          190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          195          200          205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

<210> 104

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.149

<400> 104

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln	Asn	Ser
			20					25					30		

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 105

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.154

<400> 105

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

<211> 219
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> 4G7 L1.155

<400> 106

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

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

<210> 107

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.160

<400> 107

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val
 20 25 30

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 108

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.162

<400> 108

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln	Asn	Ala
			20					25					30		

Asn	Ala	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Asn	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

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

Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
				85					90					95	

Leu	Glu	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
		115					120					125			

Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
	130					135					140				

Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145					150					155					160

Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165					170					175	

Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180					185					190		

Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 109

<211> 219

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 L1.163

<400> 109

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

<211> 219
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> 4G7 L1.164
 <400> 110

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ala
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VH CDR2 D55A

<400> 111

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

Gly

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VH CDR2 T57P

<400> 112

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Pro Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VH CDR2 K58E

<400> 113

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 114

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VH CDR2 D55S

<400> 114

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

Gly

<210> 115

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VH CDR2 D55E

<400> 115

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

Gly

<210> 116

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VH CDR3 S100T

<400> 116

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 117

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> 4G7 VH CDR3 R100dS

<400> 117
 Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Val Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 118
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> 4G7 VH CDR3 S100cT/R100dS

<400> 118
 Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Val Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 119
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> 4G7 VL CDR1 L27cQ

<400> 119
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 120
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> 4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eV

<400> 120
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 121
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR1 S27eV

<400> 121

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Val	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 122

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR1 G29A

<400> 122

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Asn	Ala	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 123

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eV/G29A

<400> 123

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln	Asn	Val	Asn	Ala	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 124

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR1 S27eA

<400> 124

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 125

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eA/G29A

<400> 125

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln	Asn	Ala	Asn	Ala	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 126

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR1 G29S

<400> 126

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Asn	Ser	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 127

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eA/G29S

<400> 127

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln	Asn	Ala	Asn	Ser	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 128

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eA

<400> 128

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln	Asn	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR2 A55N

<400> 129

Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Asn	Ser
1				5		

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR3 F96I

<400> 130

Met	Gln	His	Leu	Glu	Tyr	Pro	Ile	Thr
1				5				

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 4G7 VL CDR3 F96N

<400> 131

Met	Gln	His	Leu	Glu	Tyr	Pro	Asn	Thr
1				5				

<210> 132

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 132

Ser	Tyr	Val	Met	His
1				5

<210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 133

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

Gly

<210> 134

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 134

Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Val	Phe	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 135

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 135

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 136

Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5		

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 137

Met	Gln	His	Leu	Glu	Tyr	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 138

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 138

Ser	Tyr	Trp	Met	Asn
1				5

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 139

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

Gly.....- - - - -

<210> 140

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 140

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 141

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 141

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 142

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 142

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser
 1 5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 143

Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 144

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligante Péptido

<400> 144

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 145

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligante Péptido

<400> 145

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 146

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Ligante Péptido

<400> 146

Gly Gly Gly Ser
1

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo que se liga a CDR19, o referido anticorpo compreendendo uma cadeia leve SEQ ID NO: 106, e uma cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 87.
2. Uma composição compreendendo uma pluralidade de anticorpos glicosilados de acordo com a reivindicação 1, em que cerca de 80-100% do anticorpo glicosilado na composição compreende a estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro que não possui fucose.
3. Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou uma composição de acordo com a reivindicação 2, e um transportador farmaceuticamente aceitável.
4. Um ácido nucleico que codifica a sequência de cadeia pesada e a sequência de cadeia leve de acordo com a reivindicação 1.
5. Um anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou uma composição de acordo com qualquer das reivindicações 2-3 para uso no tratamento uma doença selecionada a partir do grupo que consiste de linfomas não Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia linfoblástica aguda das células B /linfoma (B-LLA), e linfoma das células do manto (LCM).

Figura 1

CD 19 Humano (SEQ ID NO: 1).

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPF
LKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGEL
FRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL
NQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDM
WVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAY
LIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPP GSGPQNQYGNVLSLPTPTSQL
GRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEEEEEGEGYEEDSEEDSE
FYENDSNLGQDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFL
SPHGSAWDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPD
GPDPAWGGGGGRMGTWSTR

Figura 2

> Constante Kapa de cadeia leve (Ck) (SEQ ID NO:2)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> Constante IgG1 de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:3)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Constante IgG2 de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:4)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLF
PPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Constante IgG3 de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:5)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPPEPKSCD
TTPPCPRCPPEPKSCDTTPPCPRCPPEPKSCDTTPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEAL
HNRTQKSLSLSPGK

> Constante IgG4 de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:6)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFL
FPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Constante Híbrida de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Constante Híbrida de cadeia pesada (CH) com substituições 239D e 332E (SEQ ID NO:8)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPD
VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 3a

[illegible]

Figura 3b

CH3																																				
EU Index	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257															
IgG1	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P															
IgG2	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P															
IgG3	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P															
IgG4	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P															
EU Index	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278															
IgG1	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y															
IgG2	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y															
IgG3	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	K	W	Y															
IgG4	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y															
EU Index	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299															
IgG1	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T															
IgG2	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T															
IgG3	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T															
IgG4	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T															
EU Index	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320															
IgG1	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K															
IgG2	F	R	V	V	S	V	L	T	V	V	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K															
IgG3	F	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K															
IgG4	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K															
EU Index	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340																
IgG1	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K																
IgG2	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K																
IgG3	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K																
IgG4	C	K	V	S	N	K	A	L	P	S	S	I	E	K	T	I	S	K	A	K																
CH3																																				
EU Index	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361															
IgG1	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N															
IgG2	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N															
IgG3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N															
IgG4	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	Q	E	E	M	T	K	N															
EU Index	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382															
IgG1	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	Q	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E															
IgG2	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	Q	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E															
IgG3	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	Q	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E															
IgG4	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	Q	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E															
EU Index	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403															
IgG1	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S															
IgG2	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S															
IgG3	S	S	G	Q	P	E	N	N	Y	N	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S															
IgG4	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S															
EU Index	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424															
IgG1	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S															
IgG2	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S															
IgG3	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	I	F	S															
IgG4	F	F	L	Y	S	R	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	G	N	V	F	S															
EU Index	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445															
IgG1	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P															
IgG2	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P															
IgG3	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	R	F	T	Q	K	S	L	S	L	S	P															
IgG4	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	L															
EU Index	446	447																																		
IgG1	G	K																																		
IgG2	G	K																																		
IgG3	G	K																																		
IgG4	G	K																																		

Figura 4a

Alotipo	Alotipo	Posição		
		214	356 358	431
G1m(1,17)	G1m(a,z)	K	D L	A
G1m(1,2,17)	G1m(a,x,z)	K	D L	G
G1m(3)	G1m(f)	R	E M	A
G1m(1,3)	G1m(a,f)	R	D L	A

Figura 4b

Alotipo	Alotipo	Posição 282
G2m(23)	G2m(n+)	V
	G2m(n-)	M

Figura 5

Aumento de recetor de ligação	Redução de recetor de ligação	Atividade celular	Atividade terapêutica
Somente I	-	Aumento da atividade da célula dendrítica e absorção, e subsequente apresentação de antígenos; aumento de monócitos e macrófagos de resposta ao anticorpo	Aumento da resposta imunológica com base nas células contra o alvo
IIIa		Aumento de ADCC e fagocitose de vasta gama de tipos de células	Lise celular aumentada
IIIa	IIb	Aumento de ADCC e fagocitose de vasta gama de tipos de células	Lise celular aumentada
IIb, IIc		Redução da atividade de todos os tipos de células carregando FcR exceto células NK e possível ativação das células NK via sinalização de recetor IIc	Aumento da lise das células alvo seletivo para células alvo acessíveis a células NK
IIb, IIIa	-	Possível ativação específica de células NK de ADCC mediado por célula NK	Aumento da lise das células alvo seletivo para células alvo acessíveis a células NK
IIIb		Aumento de fagócitos mediado por neutrófilo	Destruição aumentada das células alvo para células acessíveis a neutrófilo
FcαR		Aumento de fagócitos mediado por neutrófilo	Destruição aumentada das células alvo para células acessíveis a neutrófilo
I, IIa, IIIa	IIb	Aumento da atividade das células dendríticas e absorção e subsequente apresentação de antígeno para as células T; aumento de monócitos e da resposta de macrófagos ao anticorpo	Aumento da resposta imunológica com base celular contra o alvo
IIb	IIIA, iiA, I	Redução na atividade de monócitos, macrófagos, neutrófilos, NK, dendríticas e outra gama de células carregando recetor	Elimina ou reduz a citotoxicidade mediada por células contra células carregando o alvo

Figura 6a

> H0 4G7 (SEQ ID NO:9)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGGGTTLTVS
S

> L0 4G7 (SEQ ID NO:10)

DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLASG
VPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELK

> H0 HD37 (SEQ ID NO:11)

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQGLEWIGQIWPGDGD
TNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG
TSVTVSS

> L0 HD37 (SEQ ID NO:12)

DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIP
PRFSGSGSGTDFTLNHPVEKVDAAHYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

Figura 6b

> 4G7 VH CDR1 (SEQ ID NO:132):	SYVMH
> 4G7 VH CDR2 (SEQ ID NO:133):	YINPYNDGTKYNEKFKG
> 4G7 VH CDR3 (SEQ ID NO:134):	GTYYYGSRVFDY
> 4G7 VL CDR1 (SEQ ID NO:135):	RSSKSLNSNGNTYLY
> 4G7 VL CDR2 (SEQ ID NO:136):	RMSNLAS
> 4G7 VL CDR3 (SEQ ID NO:137):	MQHLEYPFT
> HD37 VH CDR1 (SEQ ID NO:138):	SYWMN
> HD37 VH CDR2 (SEQ ID NO:139):	QIWPGDGDNTNYNGKFKG
> HD37 VH CDR3 (SEQ ID NO:140):	RETTTVGRYYYAMDY
> HD37 VL CDR1 (SEQ ID NO:141):	KASQSVDDYDGDSYLN
> HD37 VL CDR2 (SEQ ID NO:142):	DASNLVS
> HD37 VL CDR3 (SEQ ID NO:143):	QQSTEDPWT

Figure 7

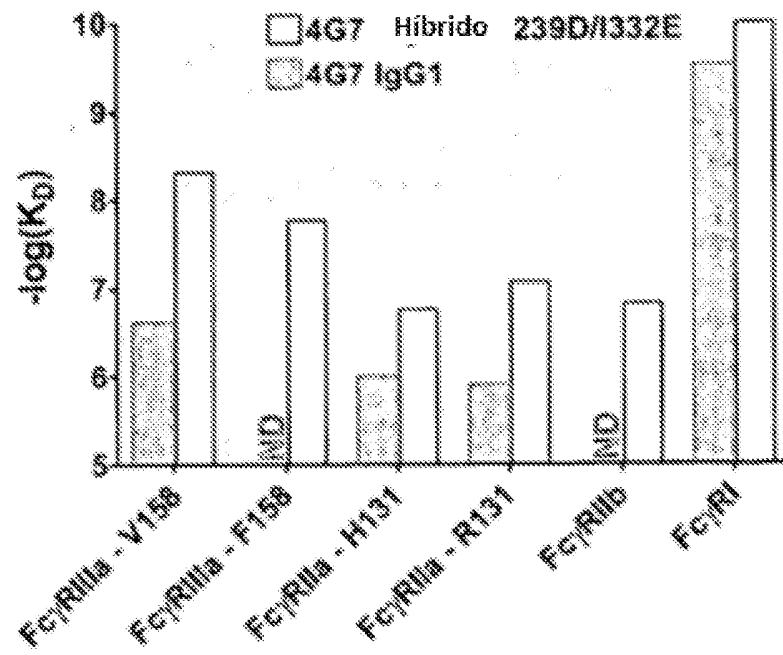


Figura 8a

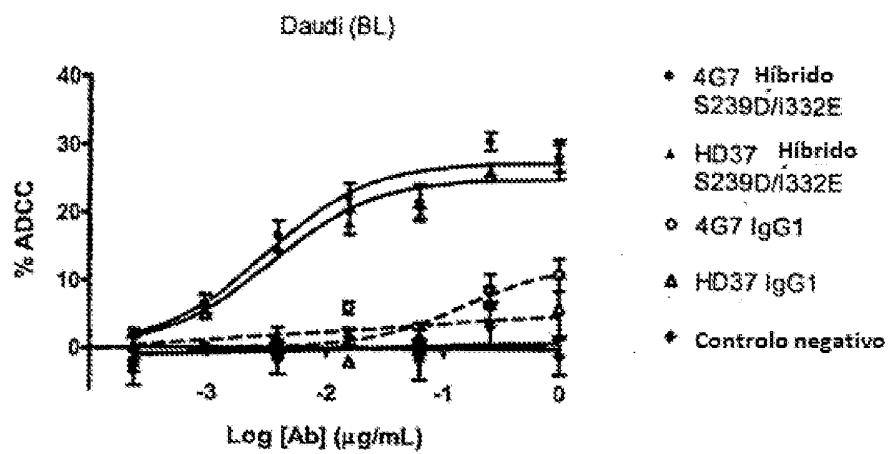


Figura 8b

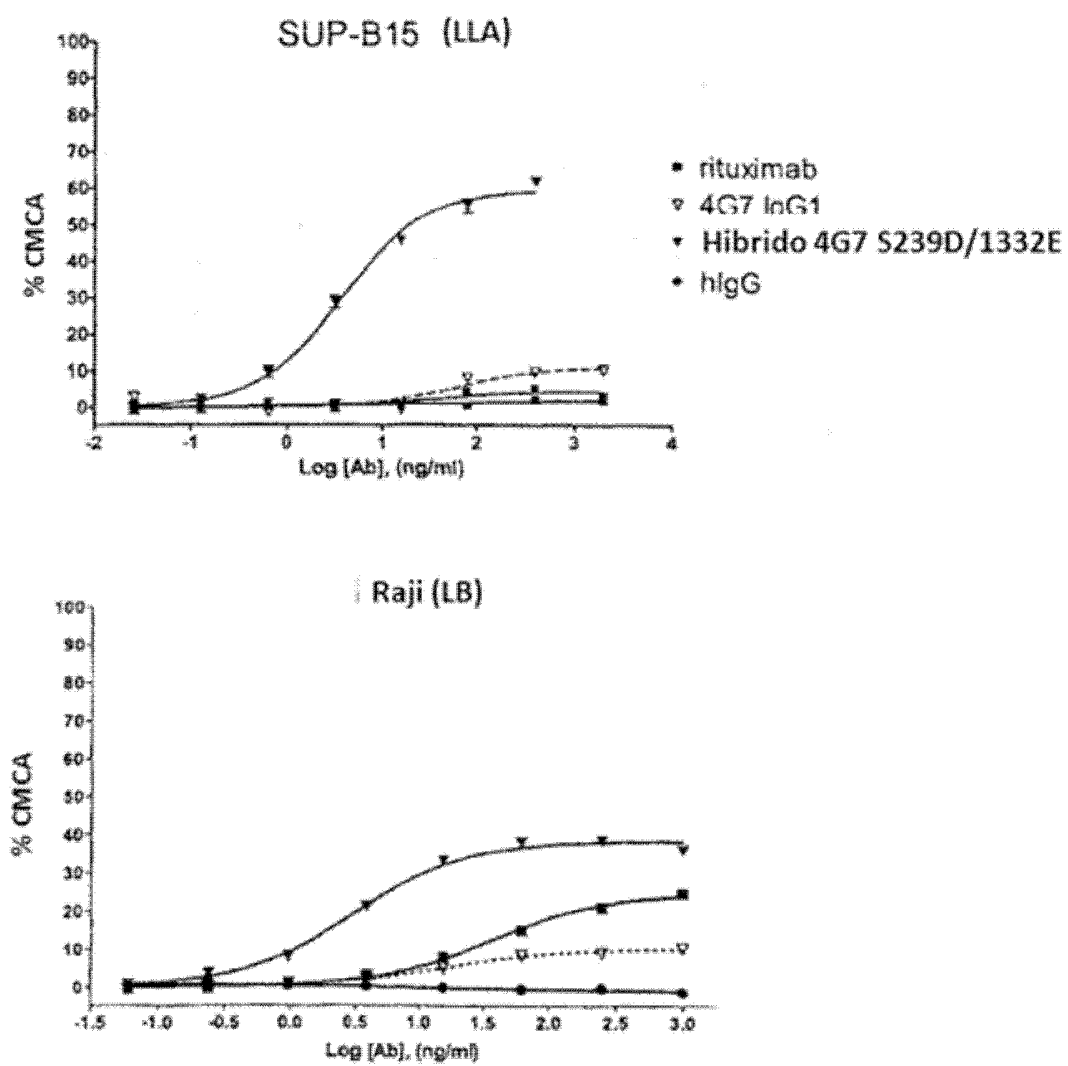


Figura 9

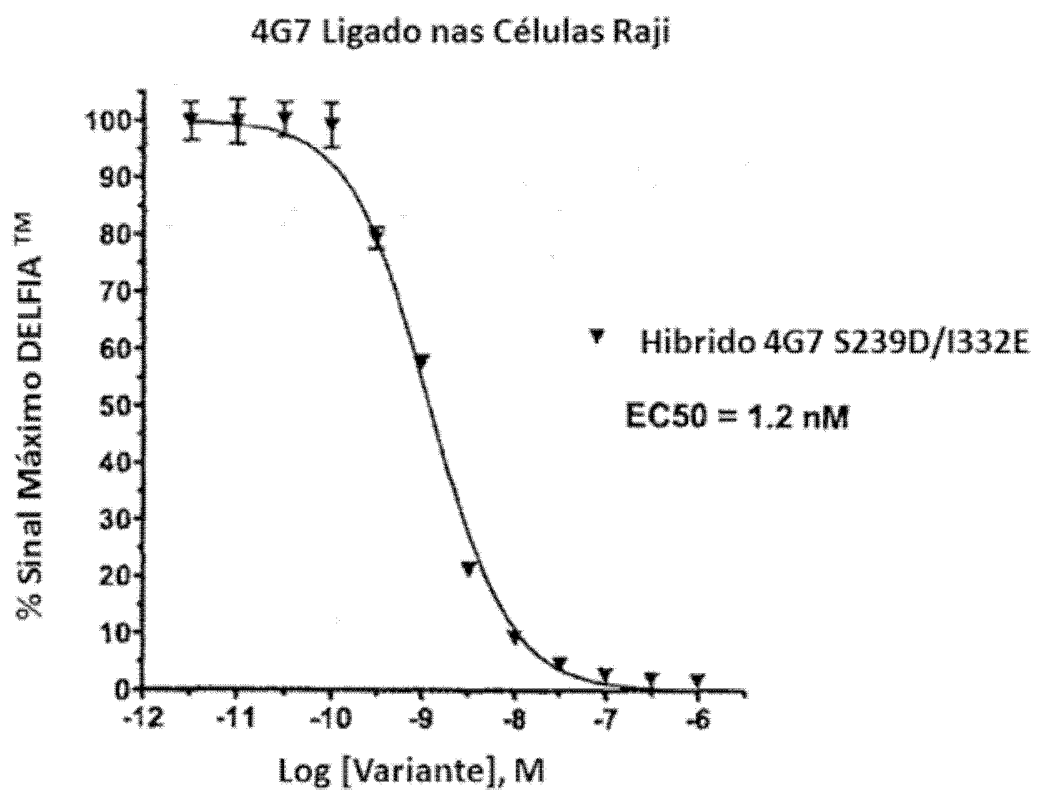


Figura 10a

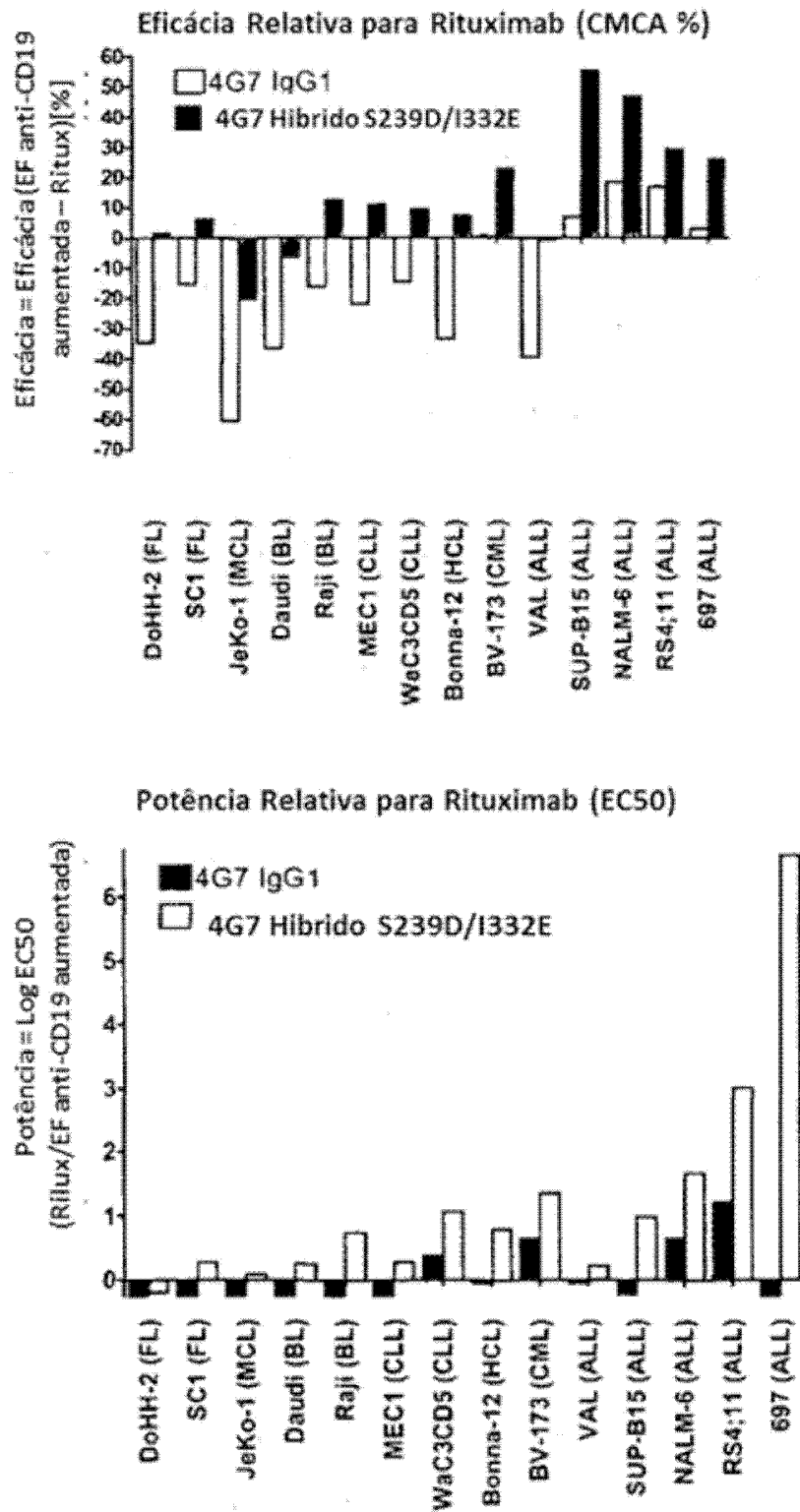


Figura 10b

Tipo de células cancerígenas	Linha de células
Leucemia células pilosas (LCP)	Bonna 12
Leucemia das células do manto (LCM)	Jeko-1
Lencemia Linfocítica Crónica (LLC)	Wac3CD5, MEC-1
Linfoma de Burkitt (LB)	Daudi, Raji
Linfoma Mielogénica Crónica (LMC)	BV-173
Linfoma Folicular (LF)	DoHH.2, SC1
Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	VAL, SUP-B15, NALM-6, RS4; 11; 697

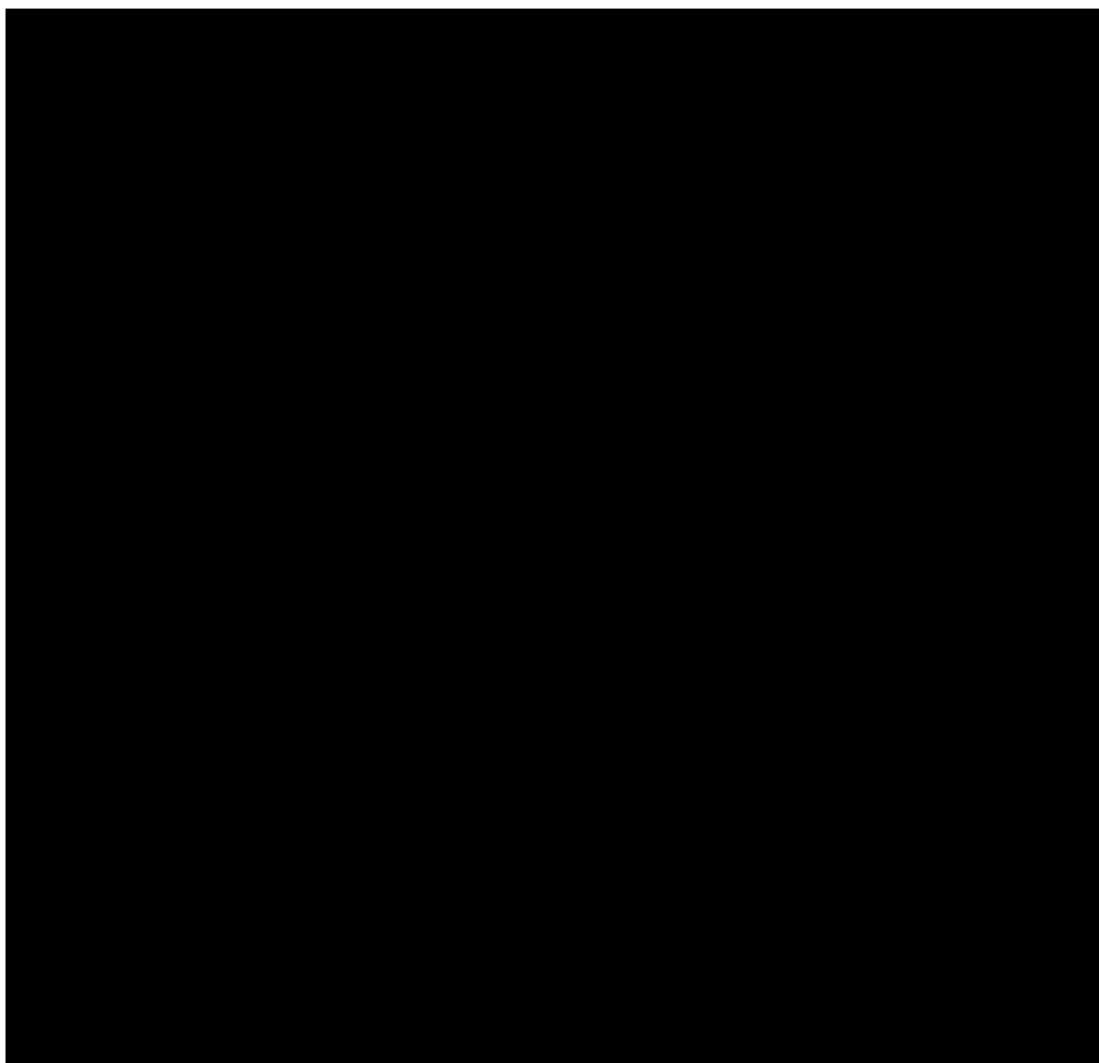


Figura 13

> H1 HD37 (SEQ ID NO:20)

TVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLEWIGQIWPGDGDT
 NYNGKFQDRVTITADESTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT
 LVTVSS

> H2 HD37 (SEQ ID NO:21)

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGYAFSSYWMNWVRQMPGKGLEWMGQIWPGDGDT
 TNYNPSLKSRTITADESTSTAYMELSSLKAEDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT
 LVTVSS

> H3 HD37 (SEQ ID NO:22)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLEWMGQIWPGDGDT
 NYNGALKSRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT
 LVTVSS

> H4 HD37 (SEQ ID NO:23)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVAQIWPGDGDT
 NYADSVKGRFTITADESTSTAYLQMNSLRAGDTAMYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT
 LVTVSS

Figura 14

> L1 HD37 (SEQ ID NO:24)

DILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDDYDGD SYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSGI
 PPRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

> L2 HD37 (SEQ ID NO:25)

DILLTQSPSSLSVTPGEKVTITCRASQSVDDYDGD SYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSGI
 PPRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

> L3 HD37 (SEQ ID NO:26)

DILLTQTPLSLPVTGPGEPAISCRASQSVDDYDGD SYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSGI
 PPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

Figura 15a

4G7

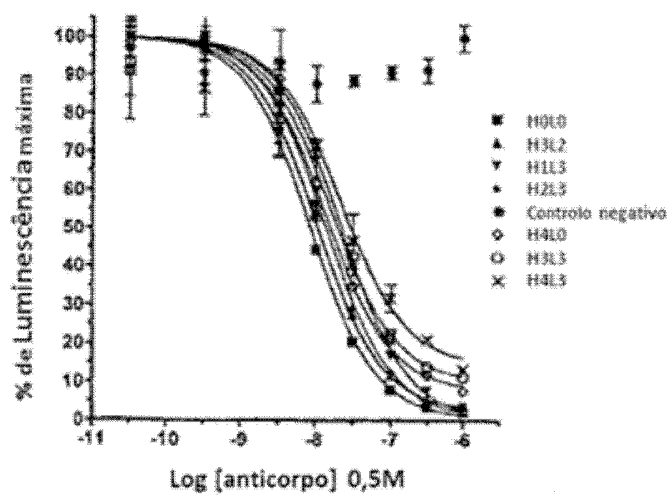
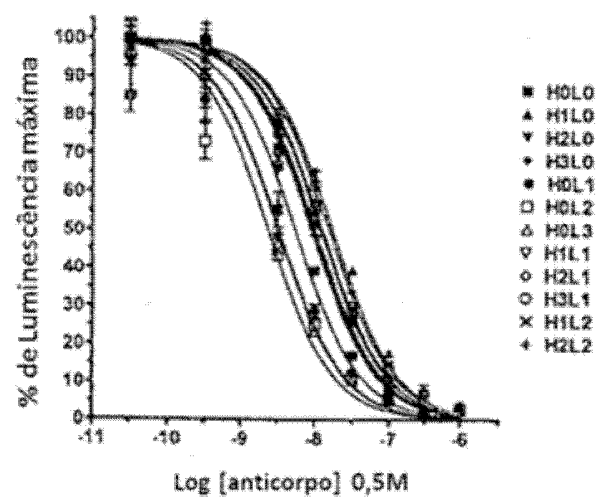


Figura 15b

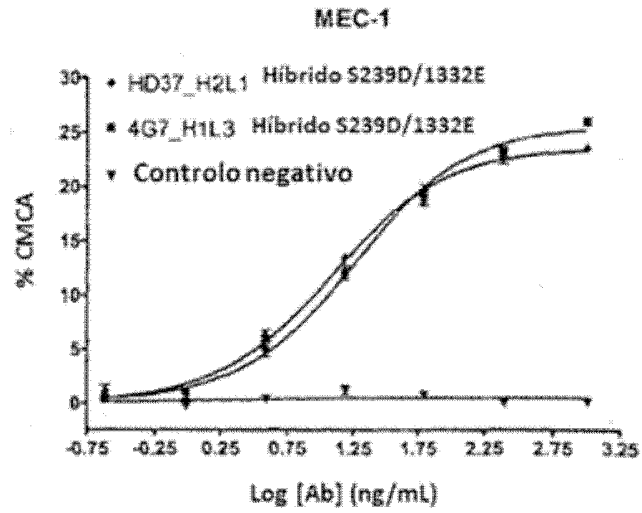


Figura 16

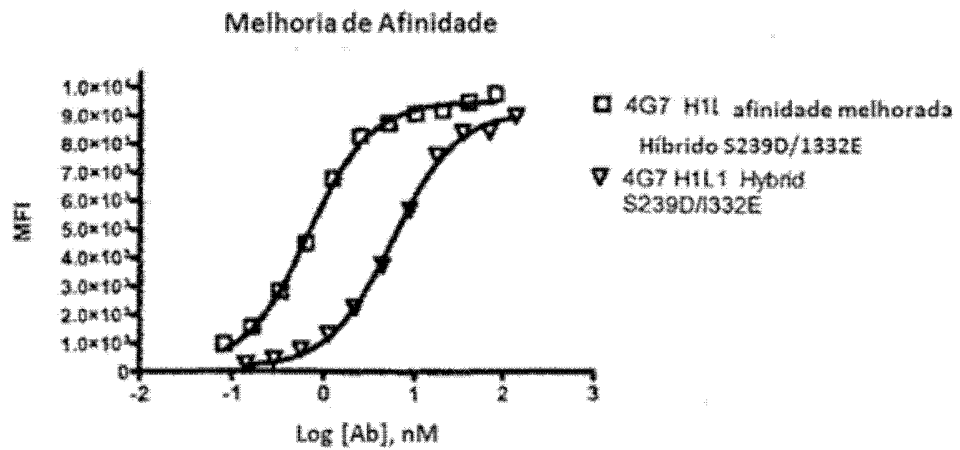


Figura 17

Melhoria de Estabilidade

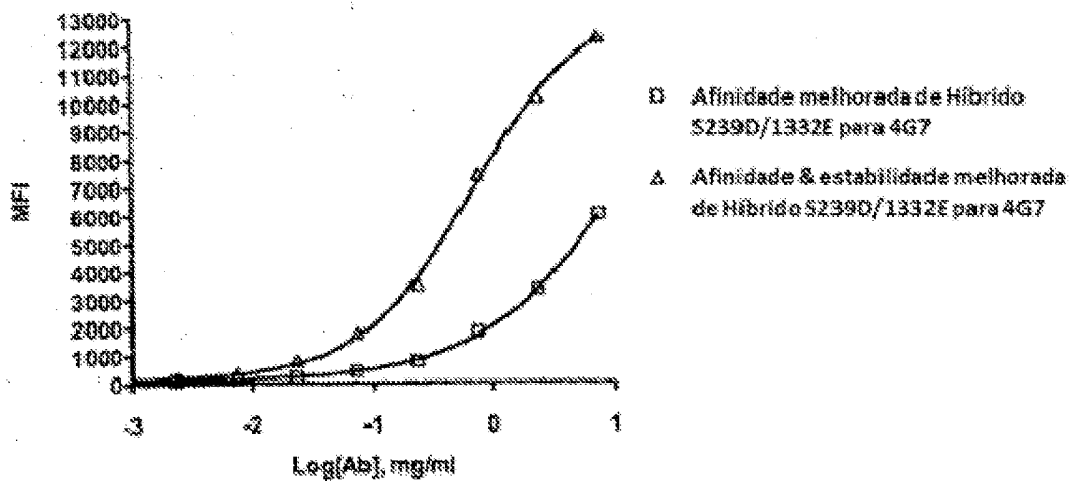


Figura 18

> 4G7 H1.109 (SEQ ID NO:27)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGPKY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.113 (SEQ ID NO:28)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGHKY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.144 (SEQ ID NO:29)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFNYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.146 (SEQ ID NO:30)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFHYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.147 (SEQ ID NO:31)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFSYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.191 (SEQ ID NO:32)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTEY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.192 (SEQ ID NO:33)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGPKY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.196 (SEQ ID NO:34)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGPKY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTSVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.199 (SEQ ID NO:35)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGPEY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.201 (SEQ ID NO:36)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNSGTKY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.202 (SEQ ID NO:37)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNEGTKY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.203 (SEQ ID NO:38)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNSGTEY
NEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGGTLTVSS

Tabela 18 (Continuação)

> 4G7 H1.204 (SEQ ID NO:39)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNEGTEY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.52 (SEQ ID NO:40)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.60 (SEQ ID NO:41)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGLRVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.62 (SEQ ID NO:42)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGSEVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.65 (SEQ ID NO:43)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGSSVFDYWGGGTLTVSS

> 4G7 H1.78 (SEQ ID NO:44)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNAGTKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGSRVFDYWGGGTLTVSS

Tabela 19

> 4G7 L1.11 (SEQ ID NO:45)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.124 (SEQ ID NO:46)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.138 (SEQ ID NO:47)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNVNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.139 (SEQ ID NO:48)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNVNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.141 (SEQ ID NO:49)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.143 (SEQ ID NO:50)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.144 (SEQ ID NO:51)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.145 (SEQ ID NO:52)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.146 (SEQ ID NO:53)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNVNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.148 (SEQ ID NO:54)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.149 (SEQ ID NO:55)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.152 (SEQ ID NO:56)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYNPFTFGAGTKLEIK

Tabela 19 (Continuação)

> 4G7 L1.154 (SEQ ID NO:57)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.155 (SEQ ID NO:58)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.160 (SEQ ID NO:59)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNANTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.161 (SEQ ID NO:60)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNSNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.162 (SEQ ID NO:61)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQANANANTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.163 (SEQ ID NO:62)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQANSNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.164 (SEQ ID NO:63)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQANANGNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.17 (SEQ ID NO:64)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYPPTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.19 (SEQ ID NO:65)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYPPTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.26 (SEQ ID NO:66)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYPPTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.3 (SEQ ID NO:67)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYPPTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.32 (SEQ ID NO:68)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNVNGNTYLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLYPPTFGAGTKLEIK

Tabela 19 (Continuação)

> 4G7 L1.46 (SEQ ID NO:69)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSHLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.54 (SEQ ID NO:70)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSGLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.55 (SEQ ID NO:71)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSYAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.64 (SEQ ID NO:72)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.67 (SEQ ID NO:73)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPVTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.68 (SEQ ID NO:74)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.8 (SEQ ID NO:75)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMKNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.80 (SEQ ID NO:76)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYFWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.9 (SEQ ID NO:77)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMLNLAS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.92 (SEQ ID NO:78)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLLS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.96 (SEQ ID NO:79)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLNSNGNTLYWFQOKPGQSPQLLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

Figura 20

IgG anti-humano (10 x excesso)
Anti-CD 19 (100 ng/mL)

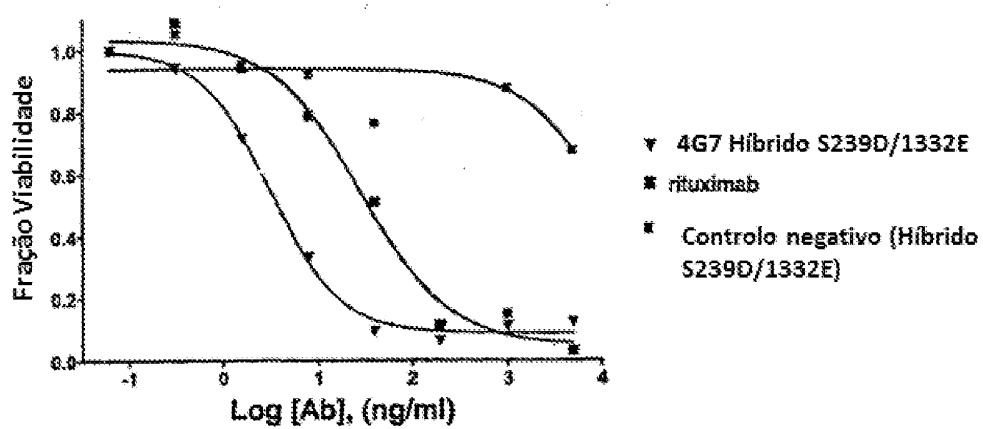


Figura 21
Ligação cruzada com um anti-Fc mAb secundária

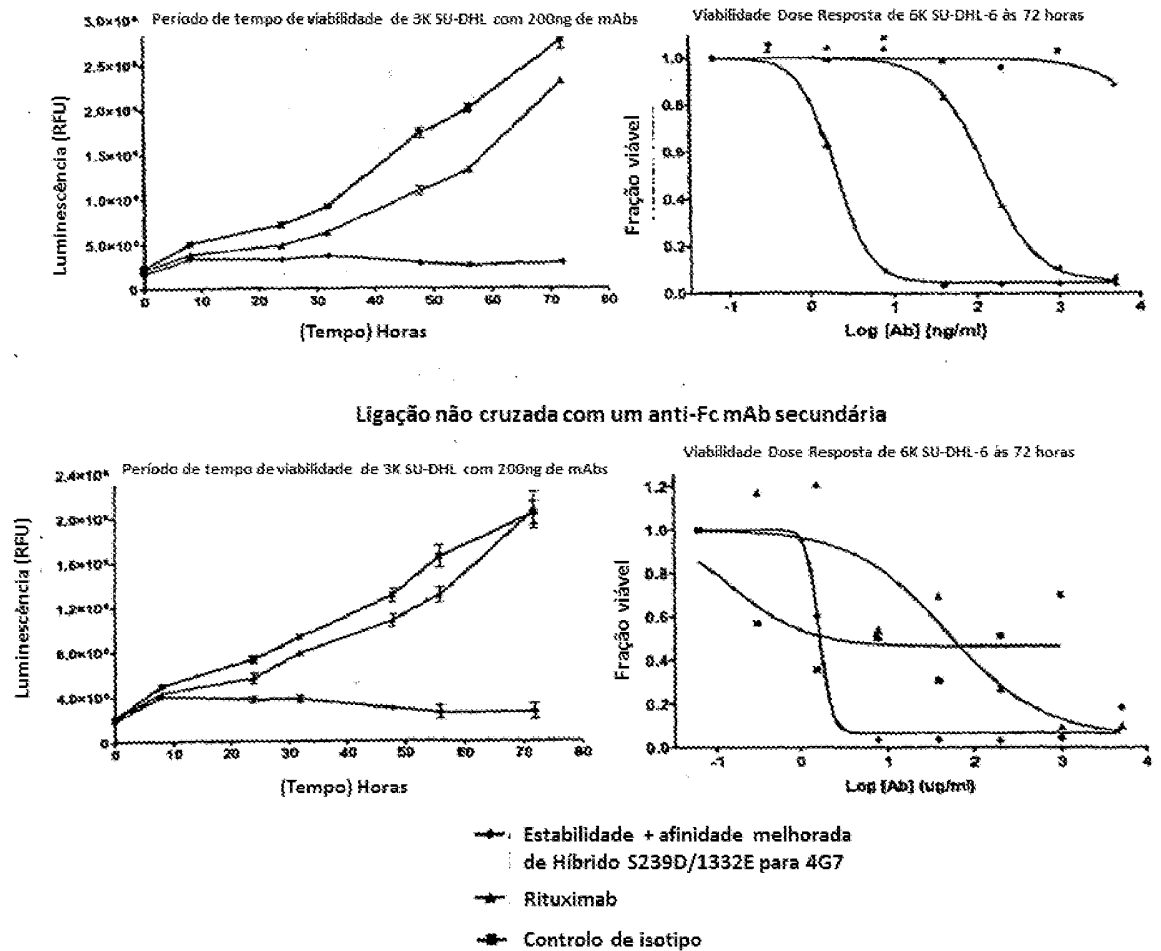
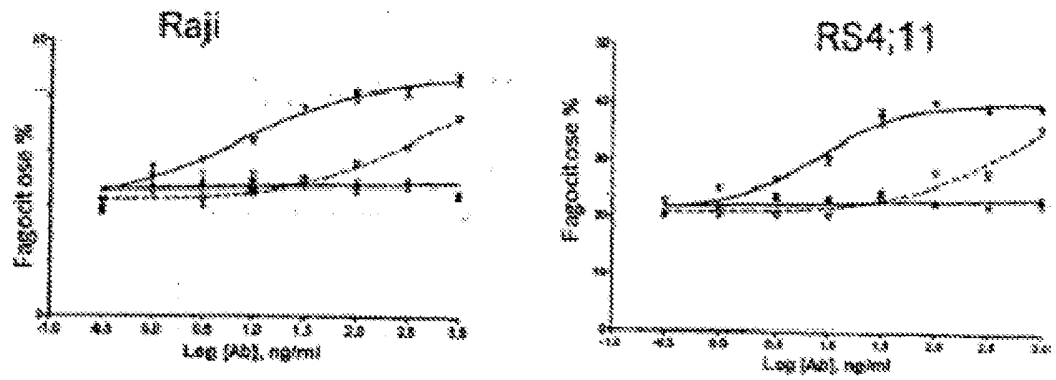


Figura 22



4G7 IgG1

Estabilidade + afinidade melhorada de
Híbrido S239D/1332E para 4G7

Controlo negativo

Figura 23

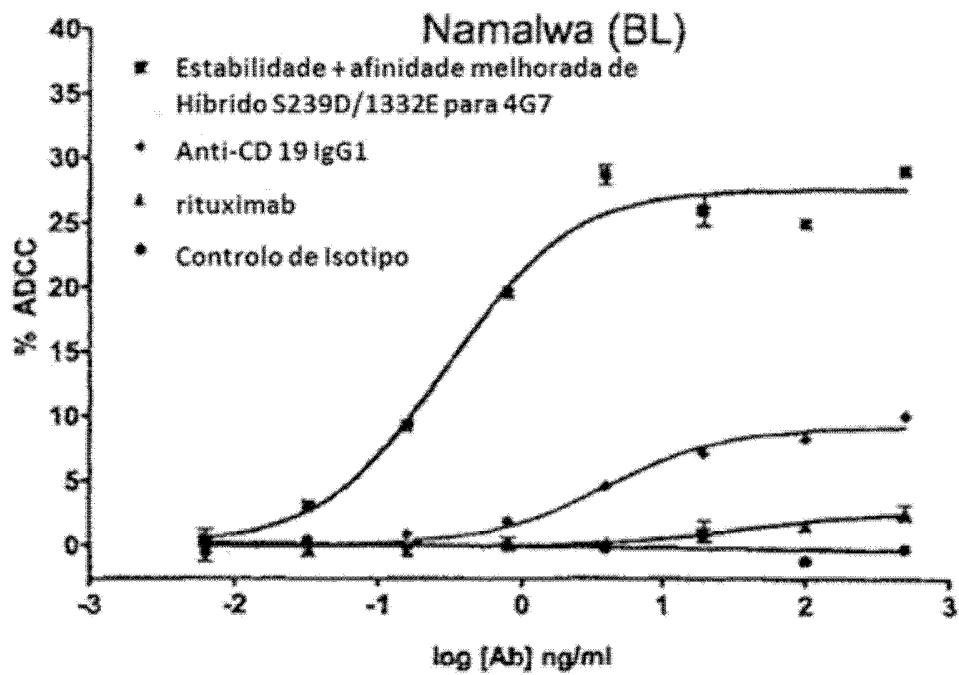
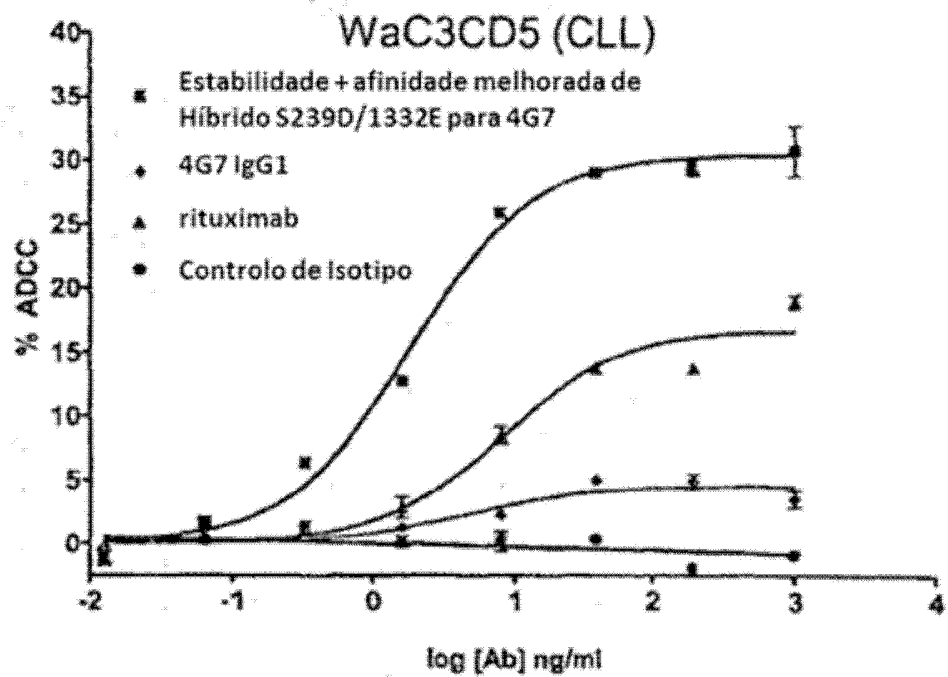


Figura 23 (continuação)

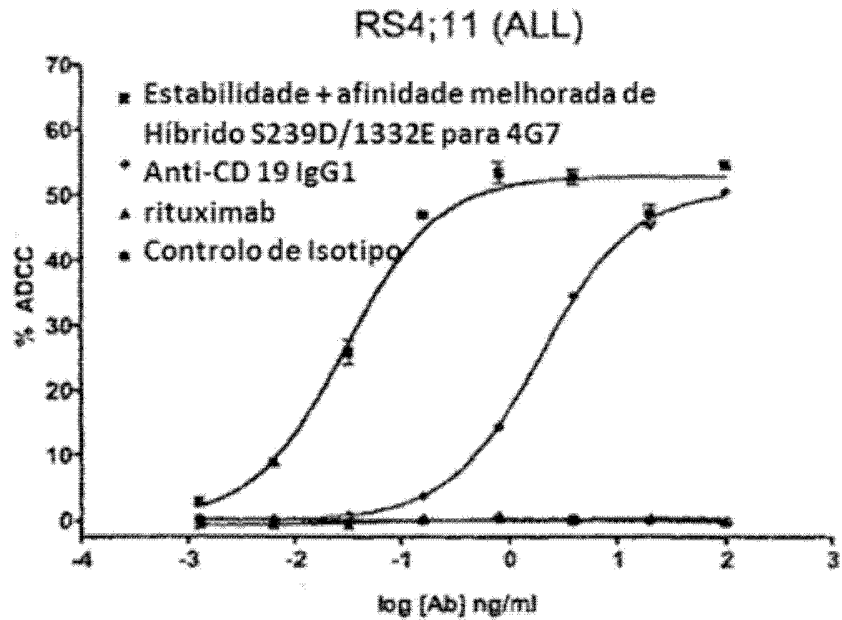
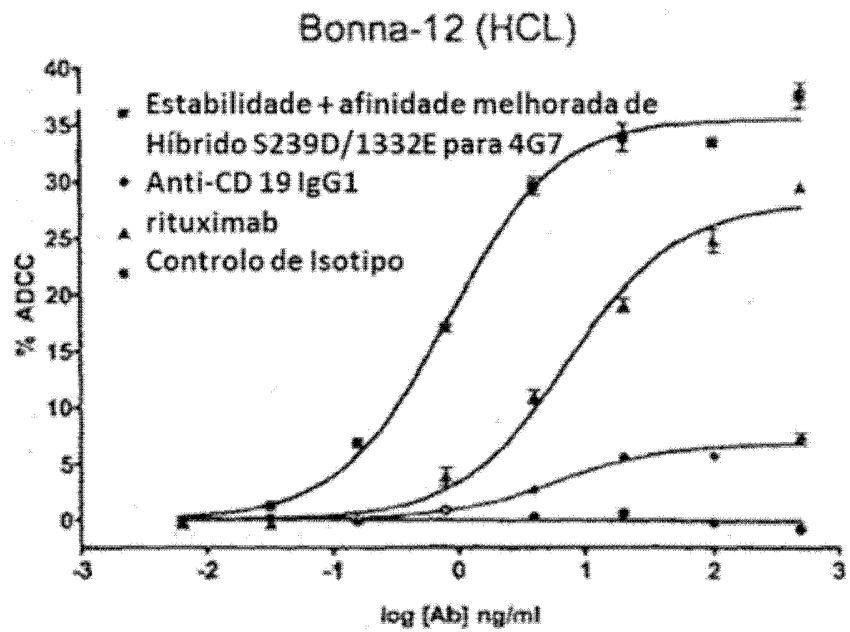
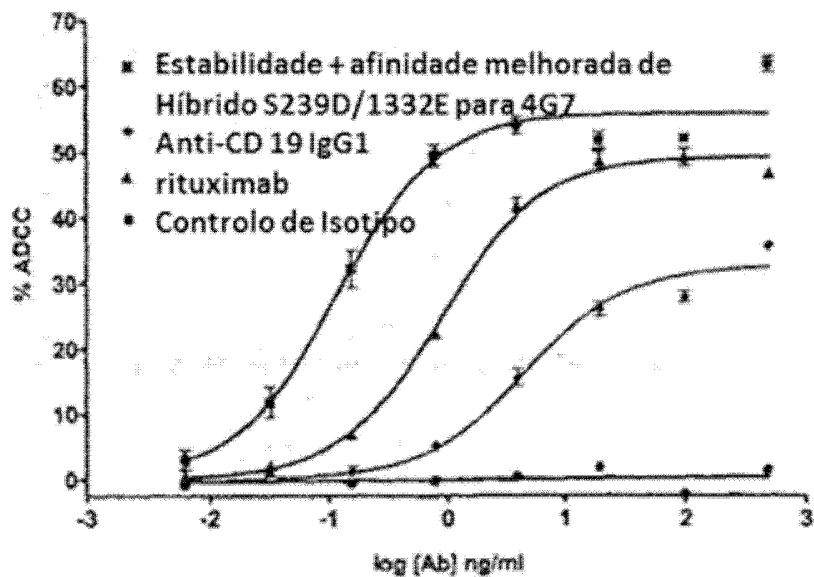


Figura 23 (continuação)

Ramos (BL)



BV-173 (CML)

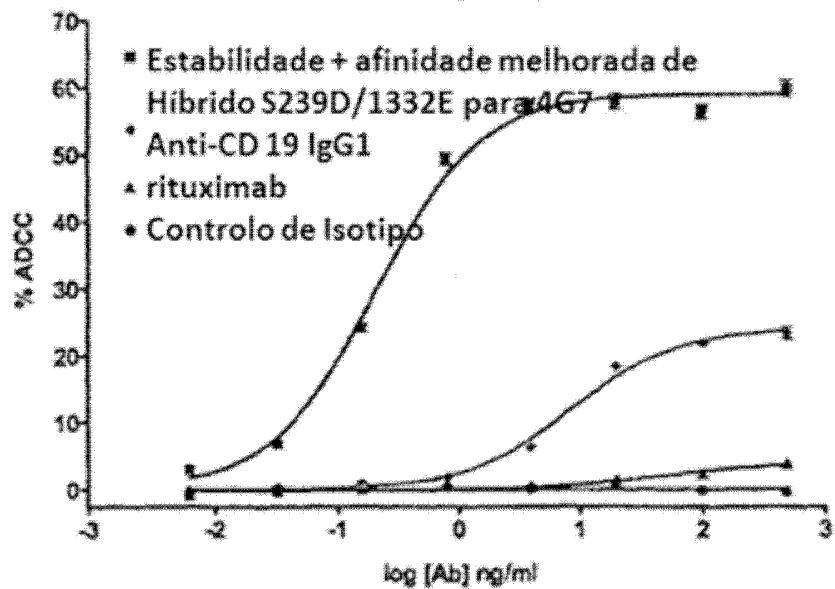


Figura 24

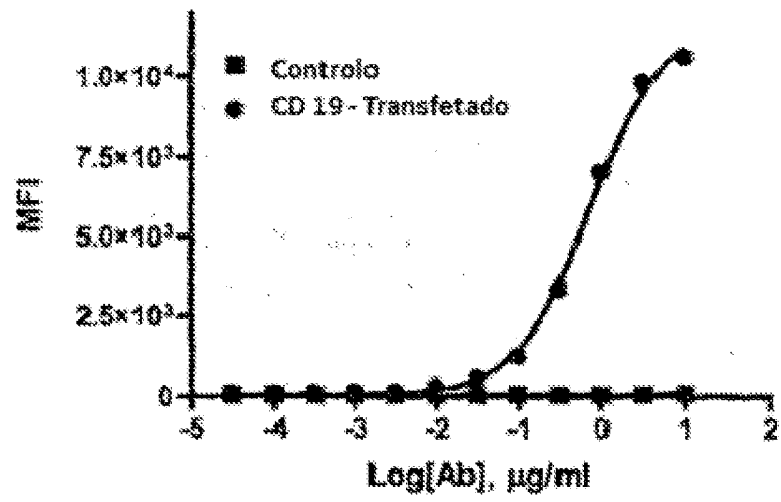


Figura 25a

Humano

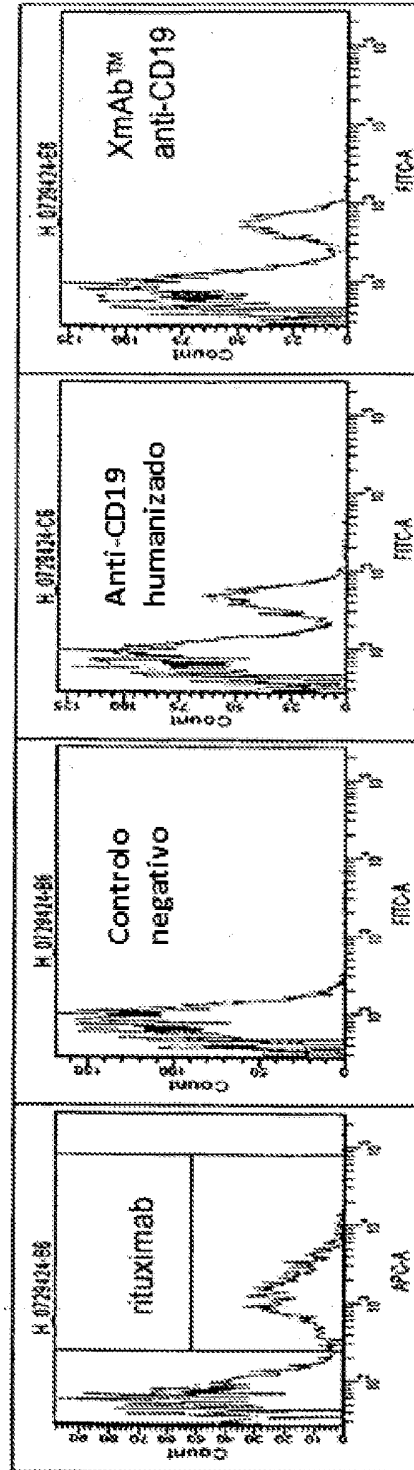
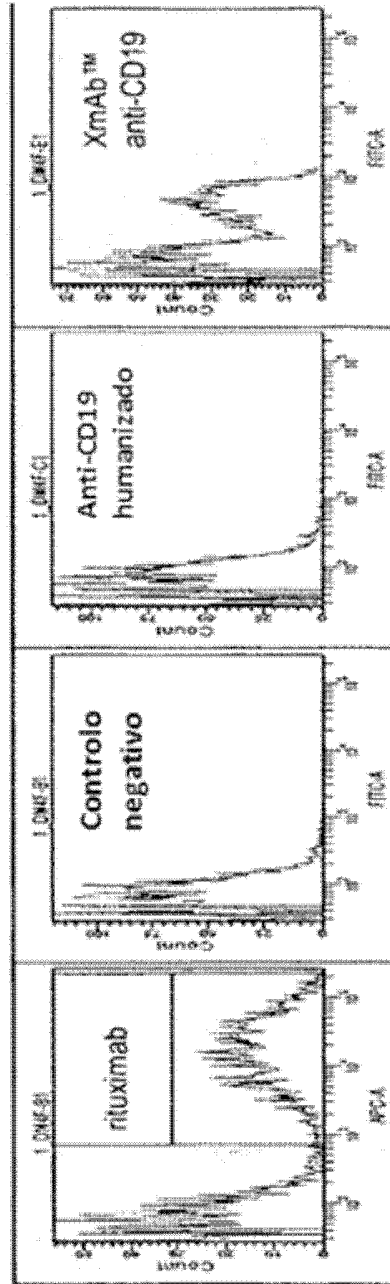


Figura 25b

Macaco Cinomolgos



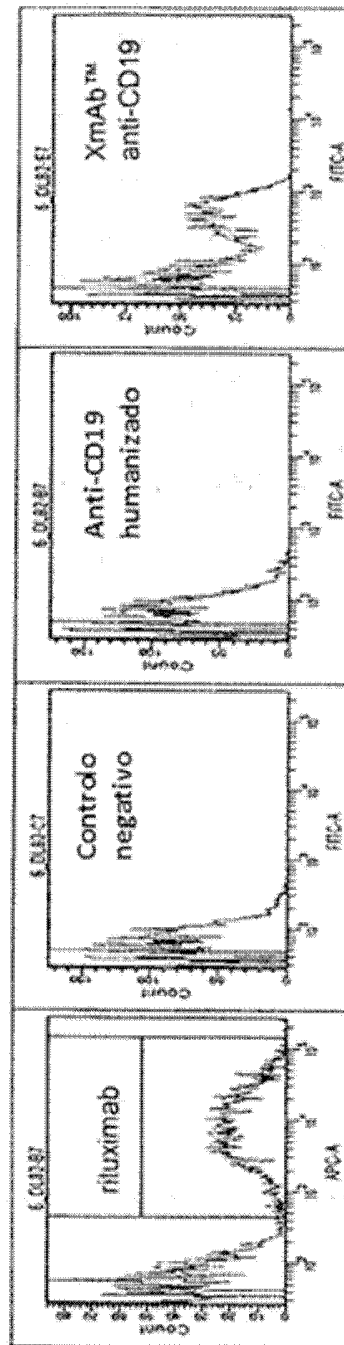
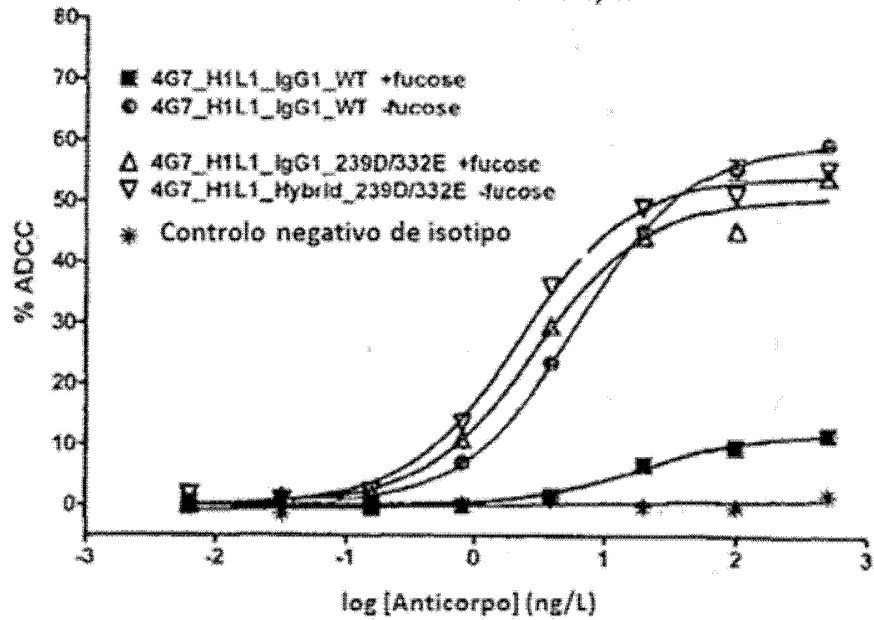
Macaco Rhesus**Figura 25c**

Figura 26

Células alvo RS4;11



Células alvo MEC-1

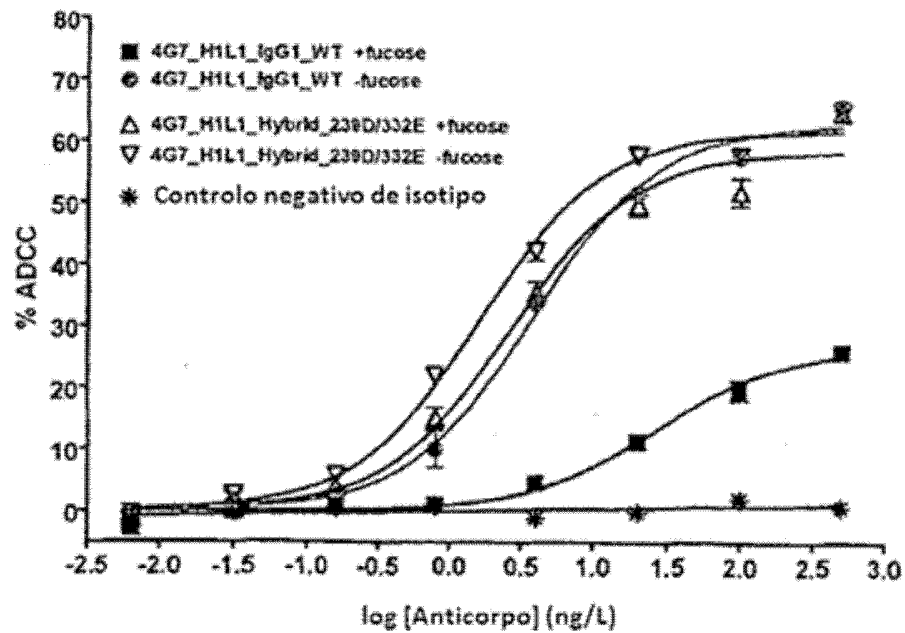


Figura 27a

Cadeia Pesada																	
	CDR-H1																
Kabat H1L1	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	35b					
	G	Y	T	F	T	S			Y	V	M	H					
		F	A		A	A			F	I		N					
			S		S	N			H	T		Y					
					V	T			P	P							
					P	P			L	S							
					I	Q			W	L							
					Q	G			V	A							
					G	V			A	Y							
					H	H			N	F							
					N	E			O	Q							
					Y	K			K	G							
					K	L				N							
						Y				K							
	CDR-H2																
Kabat H1L1	47	48	49	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	
	W	I	G	Y	I	N	P	Y			N	D	G	T	K	Y	
	F			F		D	S				D	E	A	A	R	F	
				H		S	A				S	S	N	S	O	H	
							L				H	A	E	V	E		
							I				E	H	L	P	H		
							T				Q	Q	O	I	S		
							V				P	R	H	Q	D		
							Y				R	P	P	G	P		
							Q				A	K	V	H	T		
							N				L	L	Y	N	Y		
							H				T	T	K		K		
							G				G	G					
							F				Y	Y					
							K										
	CDR-H3																
Kabat H1L1	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	101	102			
	G	T	Y	Y	Y			G	S	R	V	F	D	Y			
	A	A	F	F	F			A	A	K	I	L	N	F			
	S	S	H	H	H			S	N	E			E	H			
					P				T	O			H	P			
					L				P	H			S	L			
					W				Q	S			Q	W			
					V				G	P			R	V			
					A				V	Y			P	A			
					S				H				K	N			
					O				E				A	O			
					K				K				L	K			
									L				T				
									Y				G				

Figura 27b

Cadeia Pesada	
Kabat	CDR-L1
	24 25 26 27 27a 27b 27c 27d 27e 27f 28 29 30 31 32 33 34
HIL1	R S S K S L L N S N G N T Y L Y
Variantes	Q N V S D A D A D A F
	E T P S H S H S H
	H P F P
	S Q Y O
	D G W G
	P V H V
	T H S H
	Y E O E
	K K
	L Y
Kabat	CDR-L2
	49 50 51 52 53 54 55 56
HIL1	Y R M S N L A S
Variantes	F K A D V G A
	H Q N S I V T
	P T H P D P
	L P E F L O
	W Q O Y P G
	V G P W H N
	A V R D Q V
	N H A S N H
	O E L H Y E
	R K T Q K
	L G K L
	Y Y Y
Kabat	CDR-L3
	89 90 91 92 93 94 95 95a 95b 96 97
HIL1	M Q H L E Y P F T
Variantes	N I D F L
	Y V Q H Y
	P N P W
	F K L I
	Y S W H
	W H V P
	N R A V
	S P N N
	H T Q A
	Q G R O
	K Y K

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve				
Heavy chain	Light chain	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H3.6	L0	T30S								
H3.7	L0	S31A								
H3.8	L0	S31N								
H3.9	L0	Y34F								
H1.100	L1	N54Q								
H1.101	L1	N54P								
H1.102	L1	N54R								
H1.103	L1	N54A								
H1.104	L1	N54L								
H1.105	L1	N54T								
H1.106	L1	N54G								
H1.107	L1	N54Y								
H1.108	L1	T57V								
H1.109	L1	T57P								
H1.110	L1	T57I								
H1.111	L1	T57Q								
H1.112	L1	T57G								
H1.113	L1	T57H								
H1.114	L1	T57N								
H1.115	L1	T57Y								
H1.116	L1	T57K								
H1.120	L1	K58E								
H1.128	L1	K58E								
H1.129	L1	K58H								
H1.130	L1	K58S								
H1.131	L1	K58D								
H1.132	L1	K58P								
H1.133	L1	K58T								
H1.134	L1	K58Y								
H1.135	L1	T30V								
H1.136	L1	T30P								
H1.137	L1	T30I								
H1.138	L1	T30Q								
H1.139	L1	T30G								
H1.140	L1	T30H								
H1.141	L1	T30N								
H1.142	L1	T30Y								
H1.143	L1	T30K								
H1.144	L1	D101N								
H1.145	L1	D101E								
H1.146	L1	D101H								
H1.147	L1	D101S								
H1.148	L1	D101Q								
H1.149	L1	D101R								
H1.150	L1	D101P								
H1.151	L1	D101K								
H1.152	L1	D101A								

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve				
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.153	L1	D101L								
H1.154	L1	D101T								
H1.155	L1	D101G								
H1.156	L1	D101Y								
H1.157	L1	Y34P								
H1.158	L1	Y34L								
H1.159	L1	Y34W								
H1.160	L1	Y34V								
H1.161	L1	Y34A								
H1.162	L1	Y34N								
H1.163	L1	Y34Q								
H1.164	L1	Y34K								
H1.165	L1	Y99P								
H1.166	L1	Y99L								
H1.167	L1	Y99W								
H1.168	L1	Y99V								
H1.169	L1	Y99A								
H1.170	L1	Y99S								
H1.171	L1	Y99Q								
H1.172	L1	Y99K								
H1.173	L1	G56E								
H1.174	L1	G56L								
H1.175	L1	G56Q								
H1.176	L1	G56H								
H1.177	L1	G56P								
H1.178	L1	G56V								
H1.179	L1	G56Y								
H1.180	L1	G56K								
H1.181	L1	Y102F								
H1.182	L1	Y102H								
H1.183	L1	Y102P								
H1.184	L1	Y102L								
H1.185	L1	Y102W								
H1.186	L1	Y102V								
H1.187	L1	Y102A								
H1.188	L1	Y102N								
H1.189	L1	Y102Q								
H1.190	L1	Y102K								
H1.191	L1	K58E	S100cT							
H1.192	L1	T57P	S100cT							
H1.193	L1	K58E	R100dS							
H1.194	L1	T57P	R100dS							
H1.195	L1	S100cT	R100dS							
H1.196	L1	T57P	S100cT	R100dS						
H1.198	L1	T57P	K58E	S100cT	R100dS					
H1.199	L1	T57P	K58E	S100cT						
H1.200	L1	T57P	K58E							

Figura 28 (continuação)

Template		Variantes (numeração Kabat)								
		Cadeia pesada				Cadeia Leve				
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.52	L1	S100cT								
H1.53	L1	S100cP								
H1.54	L1	S100cQ								
H1.55	L1	S100cG								
H1.56	L1	S100cV								
H1.57	L1	S100cH								
H1.58	L1	S100cE								
H1.59	L1	S100cK								
H1.60	L1	S100cI								
H1.61	L1	S100cY								
H1.62	L1	R100dE								
H1.63	L1	R100dD								
H1.64	L1	R100dH								
H1.65	L1	R100dS								
H1.66	L1	R100dP								
H1.67	L1	R100dY								
H1.68	L1	S31T								
H1.69	L1	S31P								
H1.70	L1	S31Q								
H1.71	L1	S31G								
H1.72	L1	S31V								
H1.73	L1	S31H								
H1.74	L1	S31E								
H1.75	L1	S31K								
H1.76	L1	S31L								
H1.77	L1	S31Y								
H1.78	L1	D55A								
H1.79	L1	D55H								
H1.80	L1	D55Q								
H1.81	L1	D55R								
H1.82	L1	D55P								
H1.83	L1	D55K								
H1.84	L1	D55L								
H1.85	L1	D55T								
H1.86	L1	D55G								
H1.87	L1	D55Y								
H1.88	L1	V35P								
H1.89	L1	V35S								
H1.90	L1	V35L								
H1.91	L1	V35A								
H1.92	L1	V35Y								
H1.93	L1	V35F								
H1.94	L1	V35Q								
H1.95	L1	V35G								
H1.96	L1	V35N								
H1.97	L1	V35K								
H1.98	L1	N54H								

Figura 28 (continuação)

Modelo		Variantes (numeração Kabat)								
Cadeia pesada	Cadeia Leve	Cadeia pesada				Cadeia Leve				
		1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.99	L1	N54E								
H3.117	L1	P52aL								
H3.118	L1	P52aI								
H3.119	L1	P52aY								
H3.120	L1	P52aV								
H3.121	L1	P52aY								
H3.122	L1	P52aQ								
H3.123	L1	P52aN								
H3.124	L1	P52aH								
H3.125	L1	P52aG								
H3.126	L1	P52aF								
H3.127	L1	P52aK								
H1	L1.1					S52T				
H1	L1.10					S52Y				
H1	L1.100					S56P				
H1	L1.101					S56Q				
H1	L1.102					S56G				
H1	L1.103					S56N				
H1	L1.104					S56V				
H1	L1.105					S56H				
H1	L1.106					S56E				
H1	L1.107					S56K				
H1	L1.108					S56L				
H1	L1.109					S56Y				
H1	L1.11					E93N				
H1	L1.110					S27aT				
H1	L1.111					S27aP				
H1	L1.112					S27aQ				
H1	L1.113					S27aG				
H1	L1.114					S27aV				
H1	L1.115					S27aH				
H1	L1.116					S27aE				
H1	L1.117					S27aK				
H1	L1.118					S27aL				
H1	L1.119					S27aY				
H1	L1.12					E93K				
H1	L1.120					L54I				
H1	L1.121					L54P				
H1	L1.122					L54F				
H1	L1.123					L54Y				
H1	L1.124					L54W				
H1	L1.125					L54D				
H1	L1.126					L54S				
H1	L1.127					L54H				
H1	L1.128					L54Q				
H1	L1.129					L54K				
H1	L1.13					E93S				

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve				
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1	L1.130					Y49P				
H1	L1.131					Y49L				
H1	L1.132					Y49W				
H1	L1.133					Y49V				
H1	L1.134					Y49A				
H1	L1.135					Y49N				
H1	L1.136					Y49Q				
H1	L1.137					Y49R				
H1	L1.138					S27eV	A55N			
H1.109	L1.138	T57P				S27eV	A55N			
H1.191	L1.138	K58E	S100cT			S27eV	A55N			
H1.192	L1.138	T57P	S100cT			S27eV	A56N			
H1.195	L1.138	S100cT	R100dS			S27eV	A55N			
H1.196	L1.138	T57P	S100cT	R100dS		S27eV	A55N			
H1.198	L1.138	T57P	K58E	S100cT	R100dS	S27eV	A55N			
H1.199	L1.138	T57P	K58E	S100cT		S27eV	A55N			
H1.52	L1.138	S100cT				S27eV	A55N			
H1	L1.139					S27eV	F96N			
H1.109	L1.139	T57P				S27eV	F96N			
H1.191	L1.139	K58E	S100cT			S27eV	F96N			
H1.192	L1.139	T57P	S100cT			S27eV	F96N			
H1.193	L1.139	K58E	R100dS			S27eV	F96N			
H1.194	L1.139	T57P	R100dS			S27eV	F96N			
H1.195	L1.139	S100cT	R100dS			S27eV	F96N			
H1.196	L1.139	T57P	S100cT	R100dS		S27eV	F96N			
H1.198	L1.139	T57P	K58E	S100cT	R100dS	S27eV	F96N			
H1.199	L1.139	T57P	K58E	S100cT		S27eV	F96N			
H1.52	L1.139	S100cT				S27eV	F96N			
H1	L1.14					E93H				
H1	L1.140					S27eV	F96I			
H1.109	L1.140	T57P				S27eV	F96I			
H1.191	L1.140	K58E	S100cT			S27eV	F96I			
H1.192	L1.140	T57P	S100cT			S27eV	F96I			
H1.52	L1.140	S100cT				S27eV	F96I			
H1	L1.141					A55N	F96N			
H1.109	L1.141	T57P				A55N	F96N			
H1.191	L1.141	K58E	S100cT			A55N	F96N			
H1.192	L1.141	T57P	S100cT			A55N	F96N			
H1.193	L1.141	K58E	R100dS			A55N	F96N			
H1.194	L1.141	T57P	R100dS			A55N	F96N			
H1.195	L1.141	S100cT	R100dS			A55N	F96N			
H1.196	L1.141	T57P	S100cT	R100dS		A55N	F96N			
H1.198	L1.141	T57P	K58E	S100cT	R100dS	A55N	F96N			
H1.199	L1.141	T57P	K58E	S100cT		A55N	F96N			
H1.52	L1.141	S100cT				A55N	F96N			
H1	L1.142					A55N	F96I			
H1.109	L1.142	T57P				A55N	F96I			

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve				
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.191	L1.142	K58E	S100cT			A55N	F96I			
H1.192	L1.142	T57P	S100cT			A55N	F96I			
H1.193	L1.142	K58E	R100dS			A55N	F96I			
H1.194	L1.142	T57P	R100dS			A55N	F96I			
H1.52	L1.142	S100cT				A55N	F96I			
H1	L1.143					L27cQ	A55N			
H1.109	L1.143	T57P				L27cQ	A55N			
H1.191	L1.143	K58E	S100cT			L27cQ	A55N			
H1.192	L1.143	T57P	S100cT			L27cQ	A55N			
H1.195	L1.143	S100cT	R100dS			L27cQ	A55N			
H1.196	L1.143	T57P	S100cT	R100dS		L27cQ	A55N			
H1.198	L1.143	T57P	K58E	S100cT	R100dS	L27cQ	A55N			
H1.199	L1.143	T57P	K58E	S100cT		L27cQ	A55N			
H1.52	L1.143	S100cT				L27cQ	A55N			
H1	L1.144					L27cQ	F96N			
H1.109	L1.144	T57P				L27cQ	F96N			
H1.191	L1.144	K58E	S100cT			L27cQ	F96N			
H1.192	L1.144	T57P	S100cT			L27cQ	F96N			
H1.193	L1.144	K58E	R100dS			L27cQ	F96N			
H1.194	L1.144	T57P	R100dS			L27cQ	F96N			
H1.195	L1.144	S100cT	R100dS			L27cQ	F96N			
H1.196	L1.144	T57P	S100cT	R100dS		L27cQ	F96N			
H1.198	L1.144	T57P	K58E	S100cT	R100dS	L27cQ	F96N			
H1.199	L1.144	T57P	K58E	S100cT		L27cQ	F96N			
H1.52	L1.144	S100cT				L27cQ	F96N			
H1	L1.145					L27cQ	F96I			
H1.109	L1.145	T57P				L27cQ	F96I			
H1.191	L1.145	K58E	S100cT			L27cQ	F96I			
H1.192	L1.145	T57P	S100cT			L27cQ	F96I			
H1.52	L1.145	S100cT				L27cQ	F96I			
H1	L1.146					S27eV	A55N	F96N		
H1.109	L1.146	T57P				S27eV	A55N	F96N		
H1.191	L1.146	K58E	S100cT			S27eV	A55N	F96N		
H1.192	L1.146	T57P	S100cT			S27eV	A55N	F96N		
H1.193	L1.146	K58E	R100dS			S27eV	A55N	F96N		
H1.194	L1.146	T57P	R100dS			S27eV	A55N	F96N		
H1.195	L1.146	S100cT	R100dS			S27eV	A55N	F96N		
H1.196	L1.146	T57P	S100cT	R100dS		S27eV	A55N	F96N		
H1.198	L1.146	T57P	K58E	S100cT	R100dS	S27eV	A55N	F96N		
H1.199	L1.146	T57P	K58E	S100cT		S27eV	A55N	F96N		
H1.52	L1.146	S100cT				S27eV	A55N	F96N		
H1	L1.147					S27eV	A55N	F96I		
H1.109	L1.147	T57P				S27eV	A55N	F96I		
H1.191	L1.147	K58E	S100cT			S27eV	A55N	F96I		
H1.192	L1.147	T57P	S100cT			S27eV	A55N	F96I		
H1.193	L1.147	K58E	R100dS			S27eV	A55N	F96I		
H1.194	L1.147	T57P	R100dS			S27eV	A55N	F96I		

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeira pesada				Cadeira Leve				
Cadeira pesada	Cadeira Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.52	L1.147	S100cT				S27eV	A55N	F96I		
H1	L1.148					L27cQ	A55N	F96N		
H1.109	L1.148	T57P				L27cQ	A55N	F96N		
H1.191	L1.148	K58E	S100cT			L27cQ	A55N	F96N		
H1.192	L1.148	T57P	S100cT			L27cQ	A55N	F96N		
H1.193	L1.148	K58E	R100dS			L27cQ	A55N	F96N		
H1.194	L1.148	T57P	R100dS			L27cQ	A55N	F96N		
H1.195	L1.148	S100cT	R100dS			L27cQ	A55N	F96N		
H1.196	L1.148	T57P	S100cT	R100dS		L27cQ	A55N	F96N		
H1.198	L1.148	T57P	K58E	S100cT	R100dS	L27cQ	A55N	F96N		
H1.199	L1.148	T57P	K58E	S100cT		L27cQ	A55N	F96N		
H1.52	L1.148	S100cT				L27cQ	A55N	F96N		
H1	L1.149					L27cQ	A55N	F96I		
H1.109	L1.149	T57P				L27cQ	A55N	F96I		
H1.191	L1.149	K58E	S100cT			L27cQ	A55N	F96I		
H1.192	L1.149	T57P	S100cT			L27cQ	A55N	F96I		
H1.193	L1.149	K58E	R100dS			L27cQ	A55N	F96I		
H1.194	L1.149	T57P	R100dS			L27cQ	A55N	F96I		
H1.52	L1.149	S100cT				L27cQ	A55N	F96I		
H1	L1.15					E93R				
H1	L1.150					L27cQ	S27eV			
H1	L1.151					L27cQ	S27eV	A55N		
H1.192	L1.151	T57P	S100cT			L27cQ	S27eV	A55N		
H1.195	L1.151	S100cT	R100dS			L27cQ	S27eV	A55N		
H1.196	L1.151	T57P	S100cT	R100dS		L27cQ	S27eV	A55N		
H1.198	L1.151	T57P	K58E	S100cT	R100dS	L27cQ	S27eV	A55N		
H1.199	L1.151	T57P	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	A55N		
H1.52	L1.151	S100cT				L27cQ	S27eV	A55N		
H1	L1.152					L27cQ	S27eV	F96N		
H1.192	L1.152	T57P	S100cT			L27cQ	S27eV	F96N		
H1.195	L1.152	S100cT	R100dS			L27cQ	S27eV	F96N		
H1.198	L1.152	T57P	S100cT	R100dS		L27cQ	S27eV	F96N		
H1.198	L1.152	T57P	K58E	S100cT	R100dS	L27cQ	S27eV	F96N		
H1.199	L1.152	T57P	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	F96N		
H1.52	L1.152	S100cT				L27cQ	S27eV	F96N		
H1	L1.153					L27cQ	S27eV	F96I		
H1	L1.154					L27cQ	S27eV	A55N	F96N	
H1.192	L1.154	T57P	S100cT			L27cQ	S27eV	A55N	F96N	
H1.195	L1.154	S100cT	R100dS			L27cQ	S27eV	A55N	F96N	
H1.196	L1.154	T57P	S100cT	R100dS		L27cQ	S27eV	A55N	F96N	
H1.198	L1.154	T57P	K58E	S100cT	R100dS	L27cQ	S27eV	A55N	F96N	
H1.199	L1.154	T57P	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	A55N	F96N	
H1.52	L1.154	S100cT				L27cQ	S27eV	A55N	F96N	
H1	L1.155					L27cQ	S27eV	A55N	F96I	
H1.191	L1.155	K58E	S100cT			L27cQ	S27eV	A55N	F96I	
H1.201	L1.155	D55S	S100cT			L27cQ	S27eV	A55N	F96I	
H1.203	L1.155	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	A55N	F96I	

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)										
Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve				
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.52	L1.155	S100cT				L27cQ	S27eV	A55N	F96I	
H1	L1.16					E93P				
H1.191	L1.160	K58E	S100cT			L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I
H1.201	L1.160	D55S	S100cT			L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I
H1.202	L1.160	D55E	S100cT			L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I
H1.203	L1.160	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I
H1.204	L1.160	D55E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I
H1.52	L1.160	S100cT				L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I
H1.191	L1.161	K58E	S100cT			L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I
H1.201	L1.161	D55S	S100cT			L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I
H1.202	L1.161	D55E	S100cT			L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I
H1.203	L1.161	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I
H1.204	L1.161	D55E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I
H1.52	L1.161	S100cT				L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I
H1.191	L1.162	K58E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I
H1.201	L1.162	D55S	S100cT			L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I
H1.202	L1.162	D55E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I
H1.203	L1.162	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I
H1.204	L1.162	D55E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I
H1.52	L1.162	S100cT				L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I
H1.191	L1.163	K58E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I
H1.201	L1.163	D55S	S100cT			L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I
H1.202	L1.163	D55E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I
H1.203	L1.163	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I
H1.204	L1.163	D55E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I
H1.52	L1.163	S100cT				L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I
H1.201	L1.164	D55S	S100cT			L27cQ	S27eA	A55N	F96I	
H1.203	L1.164	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	A55N	F96I	
H1	L1.17					E93T				
H1	L1.18					E93G				
H1	L1.19					E93Y				
H1	L1.2					S52P				
H1	L1.20					L27cP				
H1	L1.21					L27cF				
H1	L1.22					L27cY				
H1	L1.23					L27cW				
H1	L1.24					L27cH				
H1	L1.25					L27cS				
H1	L1.26					L27cO				
H1	L1.27					L27cK				
H1	L1.28					S27eT				
H1	L1.29					S27eP				
H1	L1.3					S52Q				
H1	L1.30					S27eQ				
H1	L1.31					S27eG				
H1	L1.32					S27eV				
H1.109	L1.32	T57P								

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve				
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.52	L1.32	S100cT				S27eV				
H1	L1.33					S27eH				
H1	L1.34					S27eE				
H1	L1.35					S27eK				
H1	L1.36					S27eY				
H1	L1.37					L92P				
H1	L1.38					L92F				
H1	L1.39					L92Y				
H1	L1.4					S52G				
H1	L1.40					L92W				
H1	L1.41					L92N				
H1	L1.42					L92S				
H1	L1.43					L92H				
H1	L1.44					L92Q				
H1	L1.45					L92K				
H1	L1.46					N53H				
H1	L1.47					N53E				
H1	L1.48					N53Q				
H1	L1.49					N53P				
H1	L1.5					S52V				
H1	L1.50					N53R				
H1	L1.51					N53A				
H1	L1.52					N53L				
H1	L1.53					N53T				
H1	L1.54					N53G				
H1	L1.55					N53Y				
H1	L1.56					K27E				
H1	L1.57					K27H				
H1	L1.58					K27S				
H1	L1.59					K27D				
H1	L1.6					S52H				
H1	L1.60					K27P				
H1	L1.61					K27T				
H1	L1.62					K27Y				
H1	L1.63					F96W				
H1	L1.64					F96I				
H1.191	L1.64	K58E	S100cT			F96I				
H1.192	L1.64	T57P	S100cT			F96I				
H1	L1.65					F96H				
H1	L1.66					F96P				
H1	L1.67					F96V				
H1	L1.68					F96N				
H1.109	L1.68	T57P								
H1.191	L1.68	K58E	S100cT			F96N				
H1.192	L1.68	T57P	S100cT			F96N				
H1.195	L1.68	S100cT	R100dS			F96N				
H1.196	L1.68	T57P	S100cT	R100dS		F96N				

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve				
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.196	L1.66	T57P	K58E	S100cT	R100dS	F86N				
H1.199	L1.68	T57P	K58E	S100cT		F96N				
H1.52	L1.68	S100cT				F86N				
H1	L1.69					F96A				
H1	L1.7					S52E				
H1	L1.70					F96Q				
H1	L1.71					F86K				
H1	L1.72					Y94P				
H1	L1.73					Y94L				
H1	L1.74					Y94W				
H1	L1.75					Y94V				
H1	L1.76					Y94A				
H1	L1.77					Y94N				
H1	L1.78					Y94Q				
H1	L1.79					Y94R				
H1	L1.8					S52K				
H1	L1.80					Y34F				
H1	L1.81					Y34H				
H1	L1.82					Y34P				
H1	L1.83					Y34L				
H1	L1.84					Y34W				
H1	L1.85					Y34V				
H1	L1.86					Y34A				
H1	L1.87					Y34N				
H1	L1.88					Y34Q				
H1	L1.89					Y34T				
H1	L1.9					S52L				
H1	L1.90					Y34K				
H1	L1.91					A55D				
H1	L1.92					A55L				
H1	L1.93					A55P				
H1	L1.94					A55H				
H1	L1.95					A55Q				
H1	L1.96					A55N				
H1.191	L1.96	K58E	S100cT			A55N				
H1.192	L1.96	T57P	S100cT			A55N				
H1.198	L1.96	T57P	K58E	S100cT	R100dS	A55N				
H1.199	L1.96	T57P	K58E	S100cT		A55N				
H1	L1.97					A55Y				
H1	L1.98					A55K				
H1	L1.99					S56T				
H3	L2.1					K27R				
H3	L2.10					S27eN				
H3	L2.11					N28D				
H3	L2.12					N28H				
H3	L2.13					G39A				
H3	L2.14					G39S				

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)											
Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve					
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5	
H3	L2.15					N30D					
H3	L2.16					N30H					
H3	L2.17					T31A					
H3	L2.18					T31S					
H3	L2.19					Y32F					
H3	L2.2					K27Q					
H3	L2.20					Y32H					
H3	L2.21					Y34F					
H3	L2.22					Y49F					
H3	L2.23					Y49H					
H3	L2.24					R50K					
H3	L2.25					R50O					
H3	L2.26					S52A					
H3	L2.27					S52N					
H3	L2.28					N53D					
H3	L2.29					N53S					
H3	L2.3					S27aA					
H3	L2.30					L54V					
H3	L2.31					A55G					
H3	L2.32					A55V					
H3	L2.33					S56A					
H3	L2.34					H91N					
H3	L2.35					N91Y					
H3	L2.36					L92I					
H3	L2.37					L92V					
H3	L2.38					E93D					
H3	L2.39					E93Q					
H3	L2.4					S27aN					
H3	L2.40					Y94F					
H3	L2.41					Y94H					
H3	L2.42					F96L					
H3	L2.43					F96Y					
H3	L2.5					L27cl					
H3	L2.6					L27cV					
H3	L2.7					N27dD					
H3	L2.8					N27dS					
H3	L2.9					S27eA					

Figura 29

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve					Mudança do braço de ligação
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5	
H1.109	L1	T57P									1.52
H1.113	L1	T57H									1.29
H1.144	L1	D101N									2.26
H1.146	L1	D101H									2.45
H1.147	L1	D101S									2.65
H1.196	L1	T57P	S100cT	R100dS							3.42
H1.52	L1	S100cT									3.22
H1.60	L1	S100cL									1.56
H1.62	L1	R100dE									1.65
H1.65	L1	R100dS									1.41
H1.76	L1	D55A									1.14
H1	L1.11					E93N					1.59
H1	L1.124					L54W					1.47
H1.52	L1.138	S100cT				S27eV	A55N				3.93
H1.199	L1.139	T57P	K58E	S100cT		S27eV	F96N				2.36
H1.52	L1.139	S100cT				S27eV	F96N				1.80
H1.192	L1.141	T57P	S100cT			A55N	F96N				2.57
H1.199	L1.141	T57P	K58E	S100cT		A55N	F96N				4.02
H1.52	L1.143	S100cT				L27cQ	A55N				3.83
H1.192	L1.144	T57P	S100cT			L27cQ	F96N				3.63
H1.52	L1.145	S100cT				L27cQ	F96I				6.41
H1.192	L1.146	T57P	S100cT			S27eV	A55N	F96N			3.19
H1.196	L1.146	T57P	S100cT	R100dS		S27eV	A55N	F96N			3.57
H1.199	L1.146	T57P	K58E	S100cT		S27eV	A55N	F96N			4.11
H1.192	L1.146	T57P	S100cT			L27cQ	A55N	F96N			4.63
H1.199	L1.146	T57P	K58E	S100cT		L27cQ	A55N	F96N			4.34
H1.191	L1.149	K58E	S100cT			L27cQ	A55N	F96I			6.02
H1.52	L1.149	S100cT				L27cQ	A55N	F96I			8.60
H1.192	L1.152	T57P	S100cT			L27cQ	S27eV	F96N			2.98
H1.196	L1.152	T57P	S100cT	R100dS		L27cQ	S27eV	F96N			4.36
H1.199	L1.152	T57P	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	F96N			3.55
H1.192	L1.154	T57P	S100cT			L27cQ	S27eV	A55N	F96N		5.12
H1.196	L1.154	T57P	S100cT	R100dS		L27cQ	S27eV	A55N	F96N		4.44
H1.191	L1.155	K58E	S100cT			L27cQ	S27eV	A55N	F96I		4.56
H1.201	L1.155	D55S	S100cT			L27cQ	S27eV	A55N	F96I		4.48
H1.203	L1.155	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	A55N	F96I		4.73
H1.52	L1.155	S100cT				L27cQ	S27eV	A55N	F96I		6.16
H1.191	L1.160	K58E	S100cT			L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I	2.91
H1.201	L1.160	D55S	S100cT			L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I	4.51
H1.202	L1.160	D55E	S100cT			L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I	3.96
H1.203	L1.160	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I	1.76
H1.204	L1.160	D55E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I	3.46
H1.52	L1.160	S100cT				L27cQ	S27eV	G29A	A55N	F96I	4.18
H1.191	L1.161	K58E	S100cT			L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I	3.97
H1.201	L1.161	D55S	S100cT			L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I	3.89
H1.202	L1.161	D55E	S100cT			L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I	4.30
H1.203	L1.161	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I	2.92

Figura 29 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia Leve					Mudança dobra de ligação
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5	
H1.204	L1.161	D55E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I	3.27
H1.52	L1.161	S100cT				L27cQ	S27eV	G29S	A55N	F96I	3.18
H1.191	L1.162	K58E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I	3.35
H1.201	L1.162	D55S	S100cT			L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I	3.97
H1.202	L1.162	D55E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I	4.32
H1.203	L1.162	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I	3.25
H1.204	L1.162	D55E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I	4.07
H1.52	L1.162	S100cT				L27cQ	S27eA	G29A	A55N	F96I	5.57
H1.191	L1.163	K58E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I	5.32
H1.201	L1.163	D55S	S100cT			L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I	3.87
H1.202	L1.163	D55E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I	3.57
H1.203	L1.163	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I	3.20
H1.204	L1.163	D55E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I	4.73
H1.52	L1.163	S100cT				L27cQ	S27eA	G29S	A55N	F96I	3.74
H1.201	L1.164	D55S	S100cT			L27cQ	S27eA	A55N	F96I		4.41
H1.203	L1.164	D55S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	A55N	F96I		5.58
H1	L1.17					E93T					1.57
H1	L1.19					E93Y					1.76
H1	L1.26					L27cQ					1.73
H1	L1.3					S52Q					1.85
H1	L1.32					S27eV					2.61
H1	L1.46					N53H					1.75
H1	L1.54					N53G					1.50
H1	L1.55					N53Y					1.58
H1	L1.64					F96I					1.80
H1	L1.67					F96V					1.73
H1	L1.68					F95N					2.12
H1	L1.8					S52K					2.18
H1	L1.80					Y34F					1.62
H1	L1.9					S52L					1.84
H1	L1.92					A55L					1.54
H1	L1.96					A55N					1.58

