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

(21) PI 0808551-0 A2

(22) Data de Depósito: 27/02/2008
(43) Data da Publicação: 19/08/2014
(RPI 2276)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/28
A61K 39/395
C07K 14/71

(54) Título: COMPOSIÇÕES DE ANTICORPO PARA O RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO ANTIEPIDÉRMICO RECOMBINANTE

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 05/03/2007 US 60/904,773, 11/07/2007 US 60/929,727, 01/03/2007 DK PA200700317, 10/07/2007 DK PA200701016, 01/03/2007 DK PA200700317, 05/03/2007 US 60/904,773, 11/07/2007 US 60/929,727, 01/03/2007 DK PA200700317, 01/03/2007 DK PA200700317, 10/07/2007 DK PA200701016, 05/03/2007 US 60/904,773, 11/07/2007 US 60/929,727, 10/07/2007 DK PA200701016, 10/07/2007 DK PA200701016, 10/07/2007 DK PA200701016, 05/03/2007 US 60/904,773

(73) Titular(es): Symphogen A/S

(72) Inventor(es): ALLAN JENSEN, Charles Pyke, Klaus Koefoed, Lars Soegaard Nielsen, Lucilla Steinaa, Mikkel Wandahl Pedersen, Per-Joham Meijer, Robert Carlsson

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

(86) Pedido Internacional: PCT DK2008050047 de 27/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/104183de 04/09/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES DE ANTICORPO PARA O RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO ANTIEPIDÉRMICO RECOMBINANTE".**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo de anticorpos recombinantes para uso na terapia de câncer em seres humanos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) desempenha uma função importante na proliferação celular assim como na apoptose, na angiogênese e no espalhamento metastásico, processos que são cruciais para a progressão de tumores (Salomon e outros, Crit. Rev. Oncology/Haematology, 19:183-232 (1995); Wu e outros, J. Clin. Invest., 95: 1897-1905 (1995); Karnes e outros, Gastroenterology, 114:930-939 (1998); Woodburn e outros, Pharmacol. Therap. 82: 241-250 (1999); Price e outros, Eur. J. Cancer, 32A:1977-1982 (1996)). De fato, estudos mostraram que o crescimento celular mediado pelo EGFR é aumentado em uma variedade de tumores sólidos incluindo câncer pulmonar de células não-pequenas, câncer de próstata, câncer de mama, câncer gástrico e tumores de cabeça e pescoço (Salomon DS e outros, Critical Reviews in Oncology/Haematology, 19:183-232 (1995)). Além disso, é agora sabido que a ativação excessiva do EGFR na superfície das células cancerosas está associada com a doença avançada, o desenvolvimento de um fenótipo metastásico e um prognóstico fraco em pacientes com câncer (Salomon DS e outros, Critical Reviews in Oncology/Haematology 19:183-232 (1995)).

Além disso, a expressão de EGFR é frequentemente acompanhada pela produção de ligantes de EGFR, TGF-alfa e EGF entre outros, por células tumorais que expressam EGFR o que sugere que um ciclo autócrino participa da progressão destas células (Baselga e outros (1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127-154; Modjtahedi e outros (1994) Int. J. Oncology. 4: 277-296). O bloqueio da interação entre tais ligantes de EGFR e EGFR, portanto, pode inibir o crescimento e a sobrevivência de tumores (Baselga e outros (1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127-154).

O EGFR é uma glicoproteína ligada à membrana com um peso molecular de aproximadamente 170 kDa. O EGFR consiste em um domínio de ligação ao ligante externo glicosilado (621 resíduos) e um domínio citoplasmático (542 resíduos) conectados por um ligador de transmembrana curto de 23 aminoácidos. A parte extracelular do EGFR contém 25 pontes de dissulfeto e 12 sítios de glicosilação ligados a N e é geralmente considerada como consistindo em quatro subdomínios. As estruturas em cristal por raios X do EGFR sugerem que o receptor adota tanto uma conformação restrita autoinibida que não pode se ligar ao EGF (Ferguson e outros, Mol Cell, 2003, vol 11: 507-517) quanto uma conformação ativa que pode mediar a ligação ao ligante de EGF e a dimerização do receptor (Garret e outros, Cell 2002, vol 110:763-773; Ogiso e outros, Cell, 2002, vol 110:775-787). Em particular, foi sugerido que o domínio I e o domínio III fornecem contribuições aditivas para a formação de um sítio de ligação ao ligante de alta afinidade. Os domínios II e IV são regiões similares à laminina ricas em cisteína que estabilizam o dobramento das proteínas e contêm uma interface de dimerização de EGFR possível.

É sabido que o EGFR existe em um número de conformações diferentes na superfície celular, onde a conformação restrita ou fechada é a mais frequente. A conformação restrita não pode sofrer dimerização e, portanto, é inativa. O anticorpo terapêutico Erbitux é conhecido por estabilizar a conformação restrita através da ligação ao domínio III e do impedimento estérico do receptor em atingir o estado não restrito. Entretanto, alguns receptores ainda podem ser capazes de adotar a conformação não restrita, se ligarem a ligantes e sofrer dimerização. Um anticorpo monoclonal (mAb) será tipicamente eficiente somente na ligação contra uma das conformações e, portanto, não pode se dirigir eficientemente às células cancerosas que exibem outras conformações ou às células cancerosas que exibem uma variedade de conformações.

Os anticorpos monoclonais (mAbs) direcionados para o domínio de ligação ao ligante do EGFR podem bloquear a interação com os ligantes do EGFR e, concomitantemente, a via de sinalização intracelular resultante.

O Erbitux® (Cetuximab) é um anticorpo monoclonal quimérico de ser humano/camundongo recombinante que se liga especificamente ao domínio extracelular do (EGFR) humano. O Erbitux é composto das regiões Fv de um anticorpo anti-EGFR murino com regiões constantes de cadeias pesada e leve kappa de IgG1 humana e possui um peso molecular aproximado de 152 kDa. O Erbitux é produzido em cultura de células de mamífero (mieloma murino). O Erbitux é aprovado para o tratamento de pacientes com câncer colorretal metastásico e cujo tumor expressa EGFR. Em adição, o Erbitux é utilizado em combinação com terapia de radiação para tratar pacientes com câncer de células escamosas de cabeça e pescoço que não pode ser removido por cirurgia ou como um tratamento de segunda linha de câncer de células escamosas de cabeça e pescoço que não teve sucesso com a terapia padronizada à base de platina.

O Vectibix® (panitumumab) é um anticorpo monoclonal kappa IgG2 humano recombinante que se liga especificamente ao EGFR humano. O Vectibix possui um peso molecular aproximado de 147 kDa. O Panitumumab é produzido em células de mamíferos engenheiradas geneticamente (Ovário de Hamster Chinês). O Vectibix é aprovado para o tratamento de pacientes com câncer colorretal metastásico e cujo tumor expressa EGFR com progressão da doença ou após regimes de quimioterapia contendo fluoropirimidina, oxaliplatina e irinotecano.

Um número de receptores de EGF mutantes foi identificado nas células tumorais humanas. Isto pode tornar a atividade do receptor independente da ligação ao ligante (EGFRvIII) levando à maior tumorigenicidade. Os anticorpos monoclonais contra um EGFR mutante podem ser gerados, mas tal anticorpo monoclonal não será necessariamente eficiente contra o EGFR não-mutado.

Foram identificadas mutações de EGFR em pacientes humanos com câncer que afetam sua resposta à quimioterapia direcionada para o EGFR. A WO 2006/110478 (Novartis) divulgou 43 mutações assim como 18 SNPs nos quadros abertos de leitura do EGFR. Algumas mutações de sentido errado são identificadas em dois ou mais tipos de tumores. A WO

2006/091899 (Amgen) divulgou oito mutações adicionais identificadas em várias células cancerosas. Uma ou mais destas mutações podem estar localizadas no epitopo ou afetar a estrutura do epitopo ligado por um dos anticorpos monoclonais aprovados atualmente. Os pacientes que carregam tal(is) mutação(ões) não poderão ser tratados por um anticorpo monoclonal.

Além disso, há relatos na literatura que mostram a heterogeneidade na glicosilação de pelo menos um dos sítios de glicosilação (Whitson e outros, 2005 Biochemistry 44:14920-31; Zhen e outros 2003 Biochemistry 42; 5478-92). Tal heterogeneidade pode resultar diretamente ou indiretamente na exposição diferencial de epitopos que variam entre as células tumorais.

A citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) é um mecanismo alternativo através do qual os anticorpos mediam a morte das células tumorais. O nível de ADCC é dependente de vários fatores incluindo o subtipo de IgG (IgM>IgG1>IgG2), a densidade de anticorpo nas células-alvo, o padrão de glicosilação do anticorpo assim como as propriedades do próprio alvo.

Friedmann e outros (PNAS 2005, 102:1915-20) mostraram que dois anticorpos monoclonais murinos selecionados em relação à sua capacidade de inibir a ligação do EGF ao EGFR através da ligação de epitopos de EGFR distintos são capazes de regular para menos de forma sinérgica a expressão do receptor em células KB e em células CHO que expressam de forma transitória EGFR. Os anticorpos de inibição de EGF de competição cruzada não exibiam qualquer sinergia.

Modjtahedi e outros (Cell Biophysics vol 22, 1993, 129-146) testaram combinações de vários anticorpos anti-EGFR de rato com epitopos que não se sobrepõem. Os anticorpos eram de isotipos diferentes. Em todos os casos o efeito de utilizar dois anticorpos era intermediário entre os efeitos de utilizar quantidades similares dos dois anticorpos monoclonais isoladamente. Isto foi confirmado tanto *in vivo* quanto *in vitro.*

A WO 2004/032960 (Merck Patent) descreve que o uso combinado de dois anticorpos monoclonais, Mab425 e Mab225 (Cetuximab), resul-

ta em uma maior quantidade de anticorpos ligados à superfície de células cancerosas que expressam EGFR comparada a uma quantidade similar de cada um dos anticorpos monoclonais isoladamente. A publicação também descreve maior regulação para menos do EGFR quando é utilizada a combinação de anticorpos comparada com os dois anticorpos monoclonais.

Perera e outros (Clin Cancer Res 2005;11(17):6390-99) descreveram um efeito sinérgico de tratamento de camundongos que carregam xenoenxertos de U87MG.de2-7 com uma combinação de dois anticorpos monoclonais murinos. Um dos anticorpos (mAb 528) se liga a todos os subtipos de EGFR com especificidade similar à do cetuximab. O outro (mAB 806) se liga apenas ao de2-7 EGFR. A linhagem de células U87MG.de2-7 é uma linhagem de células transfectada com de2-7EGFR. A linhagem de células U87MG.DK expressa uma variação inativa de quinase do de2-7 EGFR. Não foi observada sinergia quando os dois anticorpos foram utilizados contra os camundongos que carregam os xenoenxertos de U87MG.DK. Em um modelo de xenoenxerto com a linhagem de células A431 expressando EGFR do tipo selvagem, os autores não forneceram evidência de sinergia. O de2-7 EGFR está presente apenas em um número limitado de tipos de cânceres, tal como glioma, até alguma extensão câncer de mama e cânceres pulmonares.

Embora estes estudos tenham indicado que em alguns casos a sinergia possa existir entre dois anticorpos monoclonais murinos, estes também mostram que em muitos casos, não é observada sinergia. Os estudos também não fornecem uma composição de anticorpo anti-EGFR que é eficiente contra uma faixa ampla de linhagens de células cancerosas clinicamente relevantes.

Consequentemente, existe uma necessidade de anticorpos terapêuticos melhorados contra EGFR que sejam eficientes no tratamento e/ou na prevenção de doenças relacionadas à superexpressão de EGFR quando administrados em dosagens baixas. Há ainda uma necessidade de anticorpos terapêuticos para câncer que possam ser amplamente aplicados que possam ser utilizados sem possuir conhecimento profundo em relação à

estrutura do EGFR expresso pelas células cancerosas em questão.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição de anticorpos recombinantes que compreende pelo menos 3 moléculas de anticorpos anti-EGFR distintas, em que os anticorpos se ligam aos primeiro, segundo e terceiro epitopos distintos do EGFR.

Em um aspecto adicional a invenção refere-se a uma composição de anticorpos recombinantes que compreende pelo menos duas moléculas de anticorpos para EGFR distintas, em que uma molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste nos anticorpos: 992, 1024, 1030, 1042, 1208, 1229, 1254, 1257, 1260, 1261, 1277, 1284, 1308, 1320, 1344 e 1347 ou dos anticorpos que possuem as CDRs destes anticorpos.

Preferencialmente, pelo menos uma molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste nos anticorpos 992, 1030, 1024, 1347, 1277, 1254, 1320, 1260, 1261 e 1284 ou dos anticorpos que possuem as CDRs destes anticorpos. Em uma modalidade particularmente preferida da invenção, a composição de anticorpos compreende os anticorpos 992 e 1024 ou dois anticorpos baseados em suas sequências CDR3 ou em suas sequências VL e VH ou compreende dois anticorpos com essencialmente a mesma especificidade de ligação.

As composições de anticorpos representativas da invenção provaram ser eficientes na inibição da proliferação de linhagens de células cancerosas representativas, que é indicativo de um uso *in vivo* no tratamento de câncer. Estes resultados foram confirmados em um ensaio com esferoides de células cancerosas, que pode ser mais representativo da situação *in vivo*, quando as células cancerosas formam tumores. Além disso, uma composição de anticorpos da invenção parece reduzir a motilidade das células dos esferoides de câncer e assim reduz a propensão de formar metástases. A eficiência *in vivo* em um modelo de xenoenxerto também foi demonstrada com uma composição de anticorpos representativa. Estes resultados foram confirmados com uma composição de anticorpos particularmente preferida

que consiste nos anticorpos 992 e 1024.

Em um modelo de xenoenxerto de câncer humano em camundongos, uma composição de anticorpos representativa da invenção resultou em um grau significativamente maior de diferenciação terminal das células tumorais quando comparado ao de anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente, Vectibix e Erbitux. Parece que a composição de anticorpos preferida da invenção funciona através de um mecanismo de ação diferente comparado com o dos anticorpos monoclonais uma vez que nenhum novo crescimento de tumor foi observado após o término do tratamento com a composição de anticorpos da invenção. Um novo crescimento do tumor é observado após o término do tratamento com anticorpos monoclonais.

Em estudos de ligação, os inventores demonstraram que parte dos anticorpos fornecidos com o presente relatório descritivo parece facilitar a ligação de anticorpos adicionais, aumentando assim a quantidade total de anticorpo ligado ao receptor. Foi também demonstrado que a ligação de três anticorpos do Domínio III facilita a ligação subsequente de anticorpos adicionais. Estas observações apoiam claramente o conceito de utilização de uma composição com pelo menos 3 moléculas de anticorpos anti-EGFR distintas, em que os anticorpos se ligam aos primeiro, segundo e terceiro epitopos distintos do EGFR. O efeito também pode ser obtido utilizando combinações específicas de dois anticorpos da invenção através da seleção de anticorpos que fornecem este efeito específico. Tais anticorpos são candidatos preferidos para a mistura com outros anticorpos.

As composições da invenção podem fornecer várias vantagens adicionais. As células cancerosas expressam uma variedade de EGFR. A variação é observada na conformação, na glicosilação e na estrutura primária (mutações e SNPs). Um único anticorpo monoclonal pode ser direcionado, mas não a todas estas variações de EGFR. Os mutantes de EGFR podem ser mutantes de escape para anticorpos monoclonais. Um anticorpo que compreende dois anticorpos da invenção ou três ou mais anticorpos distintos que se ligam a epitopos do EGFR distintos é menos suscetível a mutantes, SNPs, mutantes de deleção e variações na glicosilação. Isto é evi-

denciado pela eficiência ampla das misturas de anticorpos da presente invenção contra um conjunto de linhagens de células cancerosas humanas, representando diversas conformações e variações de EGFR.

A administração de um anticorpo monoclonal também pode não desativar a atividade de quinase do EGFR completamente. Uma inibição mais eficiente da sinalização pode ser conseguida através de uma combinação de anticorpos.

Pode ser, portanto, benéfico incluir anticorpos que se ligam a conformações de EGFR diferentes (por exemplo, a conformação não restrita e o dímero de receptor) em uma mistura de anticorpos. Tal mistura de anticorpos pode ser mais potente na inibição da atividade de EGFR que um anticorpo monoclonal que se liga apenas a uma das conformações.

Além disso, através da utilização de uma abordagem com três ou mais anticorpos anti-EGFR na composição pode ser possível aumentar a densidade dos anticorpos na superfície das células tumorais aumentando assim a morte através da ADCC quando comparada a dos anticorpos monoclonais.

Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a um método para a produção de uma composição de anticorpos que compreende:

a) a transfecção de uma primeira população de células eucarióticas com um primeiro construto de expressão que codifica um primeiro anticorpo que compreende um primeiro par cognato de cadeias V_H e V_L capaz de se ligar a um primeiro epitopo de EGFR distinto;

b) a transfecção de uma segunda população de células eucarióticas com um segundo construto de expressão que compreende um segundo anticorpo que compreende um segundo par cognato de cadeias V_H e V_L capaz de se ligar a um segundo epitopo de EGFR distinto;

c) a repetição opcional da etapa b) para a terceira ou populações adicionais, construtos de expressão, pares cognatos e epitopos de EGFR;

d) a seleção das primeira, segunda e opcionalmente populações de células adicionais transfectadas;

e) a combinação das populações transfectadas em um recipiente para a obtenção de um banco de células;

f) a cultura das células do banco de células sob condições que permitam a expressão dos anticorpos; e

g) a recuperação e a purificação da composição de anticorpos do sobrenadante.

Para facilitar a produção, o processamento a jusante e a caracterização de todos os anticorpos compreendem a mesma região constante de cadeia pesada.

Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a um banco de células que compreende pelo menos duas subpopulações de células eucarióticas; cada subpopulação transfectada ou transduzida com um construto de expressão que codifica um anticorpo que compreende um par cognato de cadeias V_H e V_L capaz de se ligar a um epitopo de EGFR distinto. Preferencialmente, as células são transfectadas utilizando integração específica ao sítio.

Além disso, a invenção refere-se a um método de redução da sinalização de EGFR que compreende a administração a uma composição de células que expressam EGFR, de uma composição de anticorpos da invenção e a redução da sinalização do EGFR.

A invenção refere-se ainda a um método de morte das células que expressam EGFR que compreende a administração a uma composição de células que expressam EGFR, de uma composição de anticorpos de qualquer uma da invenção e a morte das células que expressam EGFR.

É também fornecido um método de indução da apoptose nas células que expressam EGFR, que compreende a administração a uma composição de células que expressam EGFR, de uma composição de anticorpos da invenção, induzindo assim a apoptose.

Um aspecto adicional refere-se a um método de inibição da proliferação de células que expressam EGFR que compreende a administração a uma composição de células que expressam EGFR, de uma composição de anticorpos da invenção inibindo assim a proliferação.

A invenção refere-se a um método de indução da diferenciação de células tumorais *in vivo*, que compreende a administração a um indivíduo que sofre de câncer, de uma composição de anticorpos da invenção, induzindo assim a diferenciação das células tumorais. Este aspecto baseia-se nos efeitos observados na diferenciação terminal *in vivo* de células cancerosas quando expostas a uma composição de anticorpos da invenção.

Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a artigos farmacêuticos que compreendem uma composição de anticorpos da invenção e pelo menos um composto capaz de induzir a diferenciação de células cancerosas como uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia de câncer. Combinando as composições de anticorpos da invenção com agentes conhecidos por induzirem a diferenciação terminal das células cancerosas, o efeito pode ser adicionalmente aumentado.

Ainda em um aspecto adicional, a invenção refere-se a artigos farmacêuticos que compreendem uma composição de anticorpos da invenção e pelo menos um composto quimioterapêutico ou antineoplásico como uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia de câncer. É provável que a composição de anticorpos da invenção possa ser utilizada para um tratamento de segunda linha, isto é, após ou simultaneamente com o tratamento que utiliza agentes quimioterapêuticos ou antineoplásicos convencionais ou após ou simultaneamente com terapia de radiação e/ou cirurgia.

Em um aspecto separado é fornecido um polinucleotídeo selecionado do grupo que consiste em um ácido nucleico que possui a sequência de ácido nucleico mostrada na Figura 23 (SEQ ID NO: 100); um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos mostrada na Figura 23 (SEQ ID NO: 101); um ácido nucleico que possui a sequência de ácido nucleico mostrada na Figura 34A (SEQ ID NO: 102); e um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos mostrada na Figura 34B (SEQ ID NO: 103). Além disso, é fornecido um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos mostrada na Figura 23 (SEQ ID NO: 101) e um polipeptídeo que compreende a

sequência de aminoácidos mostrada na Figura 34B (SEQ ID NO: 103), vetores de expressão que compreendem o dito ácido nucleico que é definido anteriormente ligado de forma operacional a uma sequência promotora capaz de direcionar a expressão do dito ácido nucleico e uma célula transfectada ou transduzida com o dito vetor de expressão.

Estas sequências constituem as sequências de polinucleotídeos e de polipeptídeos de EGFR de Cinomólgo, isto é, de *Macaca fascicularis*. Esta espécie de macaco é um animal amplamente utilizado para estudos toxicológicos. Para uma espécie de animal ter valor em um estudo toxicológico envolvendo anticorpos contra antígenos próprios humanos, é essencial que os anticorpos também se liguem à proteína-alvo no tox-animal, preferencialmente com aproximadamente a mesma afinidade. O teste de anticorpos para a ligação ao EGFR de cinomólgo foi tornado agora possível com a contribuição dos presentes inventores. Os EGFR de cinomólgos e humano são proteínas altamente homólogas, mas de forma surpreendente foi descoberto um número de anticorpos com afinidade muito diferente para EGFR humano e de cinomólogos. Isto enfatiza a importância de utilização da proteína EGFR exata de cinomólogos para a verificação, que foi fornecida pelos presentes inventores.

Além disso, é fornecido um método para a verificação de anticorpos em relação à ligação ao EGFR de cinomólgo, que compreende as etapas de

- fornecimento de pelo menos um anticorpo de teste;
- realização de um ensaio para determinar a ligação do anticorpo ao domínio extracelular do EGFR de cinomólgo (Figura 23, SEQ ID NO: 101) ou ao EGFR de cinomólgo de comprimento completo (Figura 34B, SEQ ID NO: 103); ou à superfície das células que expressam o domínio extracelular de EGFR de cinomólgo ou a expressão do EGFR de cinomólgo de comprimento completo;
- e seleção de pelo menos um anticorpo que se liga ao domínio extracelular do EGFR de cinomólgo.

O método pode compreender ainda a verificação em relação à

ligação ao domínio extracelular do EGFR humano ou à ligação com as células que expressam o EGFR humano.

Em um aspecto adicional a invenção refere-se a um método para a identificação de anticorpos anti-EGFR capazes de aumentar a ligação simultânea de outro anticorpo anti-EGFR ao EGFR, o dito método compreendendo

a. Em um primeiro ensaio, a determinação da capacidade de ligação máxima de um primeiro anticorpo em relação a uma quantidade fixa de antígeno de EGFR,

b. Em um segundo ensaio, a saturação de uma quantidade fixa de antígeno de EGFR com um segundo anticorpo anti-EGFR,

c. O contato do complexo EGFR-anticorpo com o dito primeiro anticorpo e a determinação da capacidade de ligação máxima e

d. A comparação das capacidades de ligação para determinar se a capacidade de ligação máxima da etapa c. excede a capacidade de ligação máxima da etapa a.

Este ensaio pode ser utilizado para identificar combinações adicionais de anticorpos que possuem propriedades similares àquelas dos anticorpos 992 e 1024.

Definições

O termo "anticorpo" descreve um componente funcional do soro e é frequentemente referido como uma coleção de moléculas (anticorpos ou imunoglobulina) ou como uma molécula (a molécula de anticorpo ou a molécula de imunoglobulina). Uma molécula de anticorpo é capaz de se ligar ou de reagir com um determinante antigênico específico (o antígeno ou o epitopo antigênico), que por sua vez pode levar à indução de mecanismos efetores imunológicos. Uma molécula de anticorpo individual é geralmente considerada monoespecífica e uma composição de moléculas de anticorpos pode ser monoclonal (isto é, consistindo em moléculas de anticorpos idênticas) ou policlonal (isto é, consistindo em duas ou mais moléculas de anticorpos diferentes que reagem com o mesmo ou com epitopos diferentes no mesmo antígeno ou até mesmo em antígenos diferentes distintos). Cada molécula de

anticorpo possui uma estrutura exclusiva que possibilita que se ligue especificamente ao seu antígeno correspondente e todas as moléculas de anticorpos naturais possuem a mesma estrutura básica geral de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Os anticorpos também são coletivamente conhecidos como imunoglobulinas. É também pretendido que os termos anticorpo ou anticorpos como utilizados aqui incluam anticorpos quiméricos e de cadeia isolada, assim como fragmentos de ligação de anticorpos, tais como Fab, fragmentos Fv ou fragmentos scFv, assim como formas multiméricas tais como moléculas de IgA diméricas ou IgM pentavalentes. Um anticorpo pode ser humano, murino, quimérico, humanizado ou remoldado.

O termo "par cognato codificador de V_H e V_L" descreve um par original de sequências que codificam V_H e V_L contidas dentro ou derivadas da mesma célula que produz anticorpo. Assim, um par cognato de V_H e V_L representa o pareamento de V_H e V_L originalmente presente no doador do qual tal célula é derivada. O termo "um anticorpo expresso partindo de um par codificador de V_H e V_L" indica que um anticorpo ou um fragmento de anticorpo é produzido partindo de um vetor, plasmídeo ou similar que contém a sequência que codifica V_H e V_L. Quando um par cognato que codifica V_H e V_L é expresso, na forma de um anticorpo completo ou na forma de um fragmento estável do mesmo, este preserva a afinidade e a especificidade de ligação do anticorpo originalmente expresso da célula do qual é derivado. Uma biblioteca de pares cognatos é também chamada de um repertório ou uma coleção de pares cognatos e pode ser mantida individualmente ou agrupada.

O termo "CDR" - região de determinação de complementaridade é como definida em Lefranc e outros (2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev. Comp Immunol 27, 55-77.

O termo "um membro distinto de uma proteína policlonal recombinante" significa uma molécula de proteína de uma composição de proteínas que compreende moléculas de proteínas diferentes, mas homólogas, em

que cada molécula de proteína é homóloga às outras moléculas da composição, mas também contém um ou mais filamentos de sequência de polipeptídeo variável, que é/são caracterizado(s) por diferenças na sequência de aminoácidos entre os membros individuais da proteína policlonal.

O termo "promotores cabeça-a-cabeça" refere-se a um par de promotores que é colocado em proximidade íntima de forma que a transcrição de dois fragmentos gênicos controlada pelos promotores ocorre em direções opostas. Um promotor cabeça-a-cabeça também pode ser construído com um preenchimento ("stuffer") composto de ácidos nucleicos irrelevantes entre os dois promotores. Tal fragmento de preenchimento pode conter facilmente mais de 500 nucleotídeos. Os promotores cabeça-a-cabeça também podem ser chamados de promotores bidirecionais.

O termo "imunoglobulina" é comumente utilizado como uma denominação coletiva da mistura de anticorpos encontrada no sangue ou no soro, mas também pode ser utilizada para denominar uma mistura de anticorpos derivada de outras fontes.

O termo "molécula de imunoglobulina" significa uma molécula de anticorpo individual, por exemplo, como sendo uma parte da imunoglobulina ou uma parte de qualquer composição de anticorpos policlonais ou monoclonais.

O termo "uma biblioteca de variações de moléculas de ácidos nucleicos de interesse" é utilizado para descrever a coleção de moléculas de ácidos nucleicos, que codificam coletivamente uma "proteína policlonal recombinante de interesse". Quando utilizada para transfecção, a biblioteca de variações de moléculas de ácidos nucleicos de interesse está contida em uma biblioteca de vetores de expressão. Tal biblioteca possui tipicamente pelo menos 2, 3, 5, 10, 20, 50, 1000, 10^4, 10^5 ou 10^6 membros distintos.

O termo "transferência de massa" é utilizado para descrever a transferência de sequências de ácidos nucleicos de interesse de uma população de vetores para uma outra população de vetores e fazendo isso para cada DNA simultaneamente sem recorrer ao isolamento dos DNAs individuais de interesse. Tais populações de vetores podem ser bibliotecas que con-

têm, por exemplo, regiões variáveis, promotores, líderes ou elementos intensificadores de interesse. Estas sequências podem então ser movidas sem o isolamento prévio, por exemplo, de um vetor de fago para um vetor de expressão de mamífero. Especialmente para as sequências de anticorpos, esta técnica garante que a ligação entre a diversidade de V_H e V_L não é perdida enquanto que as bibliotecas são movidas, por exemplo, de um vetor de seleção (por exemplo, um vetor de exibição de fago) para um vetor de expressão de mamífero. Dessa maneira o pareamento original de V_H e V_L é mantido.

Como utilizado aqui, o termo "ligado de forma operacional" refere-se a um segmento que está ligado a outro segmento quando colocado em uma relação funcional com o outro segmento. Por exemplo, o DNA que codifica uma sequência sinal está ligado de forma operacional ao DNA que codifica um polipeptídeo se este for expresso na forma de um líder que participa na transferência do polipeptídeo para o retículo endoplasmático. Ainda, um promotor ou um intensificador está ligado de forma operacional a uma sequência codificadora se este estimular a transcrição da sequência.

O termo "anticorpo policlonal" descreve uma composição de moléculas de anticorpos diferentes que é capaz de se ligar a ou de reagir com vários determinantes antigênicos específicos diferentes no mesmo ou em antígenos diferentes. Geralmente, acredita-se que a variabilidade de um anticorpo policlonal esteja localizada nas assim chamadas regiões variáveis do anticorpo policlonal. Entretanto, no contexto da presente invenção, a policlonalidade pode também ser entendida para descrever diferenças entre as moléculas de anticorpos individuais que residem nas assim chamadas regiões constantes, por exemplo, como no caso de misturas de anticorpos que contêm dois ou mais isotipos de anticorpos tais como os isotipos humanos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 ou os isotipos murinos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA. Para as finalidades da presente invenção tal anticorpo policlonal também pode ser denominado "uma composição de anticorpos".

O termo "epitopo" é comumente utilizado para descrever uma proporção de uma molécula maior ou de uma parte de uma molécula maior (por exemplo, antígeno ou sítio antigênico) que possui atividade antigênica

ou imunogênica em um animal, preferencialmente um mamífero e mais preferencialmente em um ser humano. Um epitopo que possui atividade imunogênica é uma parte de uma molécula maior que ativa uma resposta de anticorpo em um animal. Um epitopo que possui atividade antigênica é uma parte de uma molécula maior à qual um anticorpo se liga de forma imunoespecífica que é determinada através de qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, através dos ensaios imunológicos descritos aqui. Os epitopos antigênicos não precisam necessariamente ser imunogênicos. Um antígeno é uma substância à qual um anticorpo ou um fragmento de anticorpo se liga de forma imunoespecífica, por exemplo, toxina, vírus, bactérias, proteínas ou DNA. Um antígeno ou um sítio antigênico possui frequentemente mais de um epitopo, a não ser que seja muito pequeno e é frequentemente capaz de estimular uma resposta imunológica. Os epitopos podem ser lineares ou conformacionais. Um epitopo linear consiste em aproximadamente 6 até 10 aminoácidos adjacentes em uma molécula de proteína que são reconhecidos por um anticorpo. Em contraste, um epitopo conformacional consiste em aminoácidos que não estão dispostos sequencialmente. Aqui o anticorpo reconhece apenas a estrutura tridimensional. Quando uma molécula de proteína se dobra em uma estrutura tridimencional, os aminoácidos que formam o epitopo são justapostos possibilitando que o anticorpo reconheça a sequência. Em uma proteína desnaturada somente o epitopo linear pode ser reconhecido. Um epitopo conformacional, por definição, tem que estar do lado de fora da proteína dobrada. Um anticorpo que reconhece o epitopo conformacional pode apenas se ligar sob procedimentos não desnaturantes suaves. Os anticorpos que se ligam a epitopos diferentes no mesmo antígeno podem ter efeitos variáveis sobre a atividade do antígeno ao qual se ligam dependendo da localização do epitopo. Um anticorpo que se liga a um epitopo em um sítio ativo do antígeno pode bloquear a função do antígeno completamente, enquanto que um outro anticorpo que se liga a um epitopo diferente pode não ter ou ter pouco efeito sobre a atividade do antígeno isoladamente. Tais anticorpos podem, entretanto, ainda ativar o complemento e resultar assim na eliminação do antígeno e pode resultar em efeitos sinérgi-

cos quando combinados com um ou mais anticorpos que se ligam a epitopos diferentes no mesmo antígeno. Na presente invenção, o epitopo é preferencialmente uma proporção do domínio extracelular do EGFR. Os antígenos da presente invenção são preferencialmente proteínas, polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos do EGFR do domínio extracelular aos quais um anticorpo ou um fragmento de anticorpo se liga de forma imunoespecífica. Um antígeno associado ao EGFR pode também ser um análogo ou um derivado do domínio extracelular do polipeptídeo do EGFR ou de um fragmento do mesmo ao qual um anticorpo ou um fragmento de anticorpo se liga de forma imunoespecífica.

Os anticorpos capazes de competir com cada outro em relação à ligação ao mesmo antígeno podem se ligar aos mesmos ou a epitopos sobrepostos ou podem ter um sítio de ligação na vizinhança próxima um do outro, de forma que a competição é principalmente causada por impedimento estérico. Os métodos para a determinação da competição entre os anticorpos são descritos nos exemplos.

Como utilizado aqui, o termo "proteína policlonal" ou "policlonalidade" refere-se a uma composição de proteínas que compreende moléculas de proteínas diferentes, mas homólogas, preferencialmente selecionadas da superfamília das imunoglobulinas. Assim, cada molécula de proteína é homóloga às outras moléculas da composição, mas também contém um ou mais filamentos de sequência de polipeptídeo variável, que é/são caracterizado(s) por diferenças na sequência de aminoácidos entre os membros individuais da proteína policlonal. Os exemplos conhecidos de tais proteínas policlonais incluem moléculas de anticorpos ou de imunoglobulinas, receptores de células T e receptores de células B. Uma proteína policlonal pode consistir em um subconjunto definido de moléculas de proteínas, que foi definido por uma característica comum tal como a atividade de ligação compartilhada em direção a um alvo desejado, por exemplo, no caso de um anticorpo policlonal contra o antígeno-alvo desejado.

Por "proteína" ou "polipeptídeo" entende-se qualquer cadeia de aminoácidos, independentemente do comprimento ou da modificação pós-

tradução. As proteínas podem existir na forma de monômeros ou de multímeros, que compreendem duas ou mais cadeias de polipeptídeos montadas, fragmentos de proteínas, polipeptídeos, oligopeptídeos ou peptídeos.

O termo "RFLP" refere-se a "polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição", um método através do qual o padrão de migração no gel dos fragmentos da molécula de ácido nucleico é analisado após a clivagem com enzimas de restrição.

O termo "mistura" descreve situações em que dois ou mais membros distintos de uma proteína policlonal compreendida de duas cadeias de polipeptídeos diferentes, por exemplo, da superfamília de imunoglobulina, são expressos partindo de uma célula individual. Esta situação pode ocorrer quando a célula individual tiver integrado, no genoma, mais de um par de segmentos gênicos, em que cada par de segmentos gênicos codifica um membro distinto da proteína policlonal. Em tais situações podem ser feitas combinações inesperadas das cadeias de polipeptídeos expressas partindo dos segmentos gênicos. Estas combinações inesperadas de cadeias de polipeptídeos poderiam não ter qualquer efeito terapêutico.

O termo "mistura de cadeias V_H-V_L" é um exemplo da mistura definida anteriormente. Neste exemplo os segmentos gênicos que codificam V_H e V_L constituem um par de segmentos gênicos. A mistura ocorre quando as combinações inesperadas de polipeptídeos de V_H e V_L são produzidas partindo de uma célula em que dois pares diferentes de segmentos gênicos que codificam V_H e V_L são integrados na mesma célula. Não é provável que tal molécula de mistura de anticorposda mantenha a especificidade original e assim poderia não ter qualquer efeito terapêutico.

O termo "transfecção" é utilizado aqui como um termo amplo para a introdução de DNA estranho em uma célula. Entende-se ainda que o termo cubra outros métodos equivalentes funcionais para a introdução de DNA estranho em uma célula, tal como, por exemplo, transformação, infecção, transdução ou fusão de uma célula doadora e uma célula receptora.

Os termos "sequência de polipeptídeo variável" e "região variável" são utilizados de forma intercambiável.

O termo "epitopos distintos" significa que quando dois anticorpos diferentes se ligam a epitopos distintos, há uma competição menor que 100% pela ligação ao antígeno, preferencialmente uma competição menor que 50% pela ligação ao antígeno, mais preferencialmente essencialmente nenhuma competição pela ligação ao antígeno. Uma análise em relação aos "epitopos distintos" de pares de anticorpos é tipicamente determinada através de experimentos de ligação sob condições de saturação de anticorpo com análise de FACS nas células que expressam EGFR e anticorpos marcados de forma fluorescente individualmente ou Ressonância de Plasmônio de Superfície utilizando antígeno de EGFR capturado ou conjugado a uma superfície de célula de fluxo como descrito nos exemplos.

O termo sendo capaz de "inibir a ligação do EGF" quando aplicado a uma molécula de anticorpo significa que a molécula de anticorpo exibe um valor de IC 50 em relação à ligação do EGF ao EGFR menor que 10 nM, preferencialmente menor que 8 nM, mais preferencialmente menor que 7 nM, mais preferencialmente menor que 5 nM, mais preferencialmente menor que 4 nM, mais preferencialmente menor que 3 nM, mais preferencialmente menor que 2 nM, mais preferencialmente menor que 2 nM, mais preferencialmente menor que 1 nM.

Os termos "receptor do fator de crescimento epidérmico", "EGFR" e "antígeno de EGFR" são utilizados aqui de forma intercambiável e incluem variações, isoformas e homólogos de espécies do EGFR humano. Em uma modalidade preferida, a ligação de um anticorpo da invenção ao antígeno de EGFR inibe o crescimento de células que expressam EGFR (por exemplo, uma célula tumoral) através da inibição ou do bloqueio da ligação do ligante de EGFR ao EGFR. O termo "ligante de EGFR" abrange todos (por exemplo, fisiológicos) os ligantes para EGFR, incluindo, mas não limitados a EGF, TGF-alfa, EGF que se liga à heparina (HB-EGF), anfirregulina (AR), herregulina, beta-celulina e epirregulina (EPI). Em uma outra modalidade preferida, a ligação de um anticorpo da invenção ao antígeno de EGFR medeia a fagocitose das células efetoras e/ou a morte de células que expressam EGFR.

Estrutura do domínio do EGFR: A parte extracelular do EGFR maduro (SwissProt acc.#P00533) consiste em 621 aminoácidos e quatro domínios receptores: O domínio I abrange os resíduos 1-165, o domínio II os resíduos 166-312, o domínio III os resíduos 313-481 e o domínio IV os 482-621 (Cochran e outros 2004 J immunol. Methods 287, 147-158). Foi sugerido que os domínios I e III contribuem para a formação de sítios de ligação de alta afinidade para os ligantes. Os domínios II e IV são regiões similares à laminina ricas em cisteína que estabilizam o dobramento das proteínas e contêm uma possível interface de dimerização de EGFR.

Como utilizado aqui, é pretendido que o termo "inibe o crescimento" (por exemplo, referindo-se às células) inclua qualquer decréscimo mensurável na proliferação (aumento no número de células) ou no metabolismo de uma célula quando colocada em contato com um anticorpo anti-EGFR quando comparado com o crescimento das mesmas células que não estão em contato com um anticorpo anti-EGFR, por exemplo, a inibição do crescimento de uma cultura de células em pelo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 100%.

Como utilizado aqui, os termos "inibe a ligação" e "bloqueia a ligação" (por exemplo, referindo-se à inibição/bloqueio da ligação do ligante de EGFR ao EGFR) são utilizados de forma intercambiável e abrangem a inibição/bloqueio tanto parcial quanto completo. A inibição/bloqueio do ligante de EGFR ao EGFR preferencialmente reduz ou altera o nível normal ou o tipo de sinalização celular que ocorre quando o ligante de EGFR se liga ao EGFR sem inibição ou bloqueio. É também pretendido que a inibição e o bloqueio também incluam qualquer decréscimo mensurável na afinidade de ligação do ligante de EGFR ao EGFR quando em contato com um anticorpo anti-EGFR quando comparado com o ligante que não está em contato com um anticorpo anti-EGFR, por exemplo, o bloqueio dos ligantes de EGFR ao EGFR em pelo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%,50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 100%.

O termo "anticorpo recombinante" é utilizado para descrever uma molécula de anticorpo ou várias moléculas que são expressas partindo

de uma célula ou uma linhagem de células transfectada com um vetor de expressão que compreende a sequência codificadora do anticorpo que não está associado naturalmente com a célula.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 Separação de esplenócitos (para detalhes, vide o Exemplo 1). São realizadas as saídas a seguir (representadas):

• Saída 1: Células vivas (representação gráfica de FSC/Iodeto de Propídio). (Painel esquerdo inferior)

• Saída 2: As células plasmáticas são passadas na forma de CD43 pos/CD138 pos. (painel direito inferior)

• Saída 3: discriminação de pares (painel direito superior)

Figura 2 mSymplex® PCR Murino. RT-PCR com extensão em sobreposição Multiplex para a amplificação e a ligação cognata de genes de anticorpos de cadeias pesada e leve de uma única célula. Para detalhes, referência é feita ao Exemplo 1.

Figura 3 Clonagem do repertório murino. Um conjunto de produtos da mSymplex® PCR que codificam os pares gênicos de VH/VL de células plasmáticas isoladas foi unido ao gene que codifica a cadeia leve constante kappa humana através da junção pela extensão por sobreposição. O conjunto de genes, que codifica anticorpos quiméricos humanos-murinos completos, foi inserido em um vetor de expressão seguido por uma inserção de um cassete promotor bidirecional (2xCMV).

Figura 4 A Representação esquemática do vetor de expressão 00-VP-002 do anticorpo de comprimento completo de mamífero. Amp e Amp pro, gene de resistência à ampicilina e seu promotor; origem de pUC, origem de replicação de PUC; CMV, promotor de mamífero que controla a expressão da cadeia leve e da cadeia pesada; Líder de IGHV, líder genômico da cadeia pesada humana; preenchimento H ("Stuffer"), inserto que é trocado pela sequência codificadora da região variável de cadeia pesada; IGHG1, sequência que codifica a região constante da cadeia pesada do isotipo G1 da imunoglobulina genômica (a sequência é mostrada no Apêndice 2); B-globina A de coelho, sequência poliA da beta-globina de coelho; Líder de

IGKV, líder kappa murino; Preenchimento L, inserto que é trocado pela sequência codificadora da cadeia leve; SV40 term, sequência terminadora do vírus símio 40; FRT, sítio-alvo de reconhecimento de Flp; Neo, gene de resistência à neomicina; poli A de SV40, sequência sinal poli A do vírus símio 40.

Figura 5 Análise em grupo da diferença de absorbância em 450-620 nm. Os sobrenadantes são agrupados em relação à reatividade que é indicada pelo número (1 até 4) após o Nº do clone. Cinza-escuro indica um decréscimo no número de células metabolicamente ativas, enquanto que cinza-claro indica um aumento no número de células metabolicamente ativas. Preto indica sobrenadantes sem efeito sobre o número de células metabolicamente ativas.

Figura 6 Grau de inibição de anticorpos Anti-EGFR com anticorpos de referência listados direcionados contra domínios de EGFR específicos que é determinado em um ELISA competitivo. A) Cálculo da inibição. B) Classificação da inibição como a seguir: 25 - 49%: Competição moderada (+); 50 - 74%: Competição forte (++); 75 - 100%: Competição muito forte (+++). As caixas que exibem inibição significativa (50-100%) estão sombreadas em cinza. Erbitux e Vectibix são mostrados em duplicatas (quatro experimentos independentes) para ilustrar a capacidade de reprodução do ensaio. Ab2 (225) é o precursor murino que leva ao Erbitux.

Figura 7: Ilustração de um ciclo de mapeamento de epitopo realizado na máquina Biacore 3000 SPR, em que uma mAb da amostra é submetido à competição de ligação ao domínio extracelular de EGFR com quatro anticorpos de referência diferentes.

Figura 8: Grau de inibição de anticorpos Anti-EGFR com anticorpos de referência listados direcionados contra domínios de EGFR específicos que é determinado através da análise de competição com tecnologia de. A) Cálculo da inibição. B) Classificação da inibição como a seguir: 25 - 49%: Competição moderada (+); 50 - 74%: Competição forte (++); 75 - 100%: Competição muito forte (+++). As células que exibem inibição significativa (50-100%) estão sombreadas em cinza. O clone 1229 marcado com *

não se ligava no ensaio Biacore.

Figura 9: Determinação de grupos de epitopos dentro do repertório de anticorpos Anti-EGFR através da análise de competição de SPR dos pares de anticorpos Anti-EGFR. Os anticorpos são agrupados de acordo com o reconhecimento dos domínios de EGFR presumidos. As células nas quais foi observado que as combinações de anticorpos se ligavam aos epitopos sobrepostos resultando em mais de 50% de inibição estão sombreadas em cinza. As células nas quais as determinações não foram realizadas estão coloridas de preto. A) Cálculo da inibição. B) Classificação da inibição como a seguir: 25 - 49%: Competição moderada (+); 50 - 74%: Competição forte (++); 75 - 100%: Competição muito forte (+++).

Figura 10: Mapas de epitopos de anticorpos de referência e anticorpos Anti-EGFR direcionados contra o domínio extracelular de EGFR que são determinados através da análise Biacore. A) Mapa de epitopos de anticorpos direcionados contra o domínio I ou o domínio I/II do Domínio Extracelular (ECD) do EGFR. B) Mapa de epitopos de anticorpos direcionados contra o domínio III do ECD do EGFR.

Figura 11: Investigação da ligação simultânea de uma mistura oligoclonal de anticorpos direcionados contra epitopos que não se sobrepõem no EGFR. A) Adição sequencial de anticorpos contra o domínio III, o domínio I ou especificidade desconhecida. Os valores de inibição de mAbs de amostras isoladas testados contra misturas de mAb diferentes ou mAb isolado são mostrados nas caixas sombreadas. Os valores de Ru max utilizados para calcular a inibição também são mostrados. B) Análise de competição de seis mAbs de amostras distintas direcionados contra epitopos que não se sobrepõem no EGFR e uma mistura de anticorpos contendo os seis anticorpos testados. As misturas de anticorpos quando o anticorpo da amostra testada não era incluído serviam como um controle positivo. Os valores de inibição de mAbs de amostras isoladas testados contra misturas de mAb diferentes são mostrados nas caixas sombreadas. Os valores de Ru max utilizados para calcular a inibição também são mostrados. C) Sensogramas correspondentes da análise em B ilustrando o bloqueio do anticorpo e, em

alguns casos, o aumento da ligação do anticorpo. D) Teste de anticorpos adicionais direcionados contra os domínios I, I/II e especificidade desconhecida contra as seis misturas de anticorpos mAb.

Figura 12: Determinação do bloqueio do ligante de EGF mediado por anticorpo através da titulação do anticorpo no EGFR de comprimento completo e detecção da ligação ao ligante de EGF biotinilado com um reagente HRP com estreptavidina. Erbitux, Vectibix e Synagis IgG (palivizumab) foram utilizados como controles positivo e negativo respectivamente. Após o bloqueio do epitopo do anticorpo reconhecido com os anticorpos testados, o grau de competição do ligante de EGF foi visualizado através da adição de 0,1 µg/mL de ligante de EGF biotinilado e um conjugado de Estreptavidina-HRP secundário para detecção.

Figura 13. Efeito do pré-tratamento com os anticorpos indicados sobre a fosforilação do EGFR induzida pelo EGF (50 ng/mL) em células HN5. Os anticorpos (10 µg/mL) que são citados no gráfico foram incubados com as células durante 30 min antes da adição do EGF durante 7,5 min. Os conjuntos de dados marcados com * eram significativamente diferentes do conjunto de dados de controle ((-)ctrl) ($p<0,05$). A. 1208 tinha um efeito protetor significativo sobre a fosforilação do EGFR. B. 1277 e 1320 protegem significativamente contra a fosforilação induzida por EGF. As barras de erro representam os desvios-padrão de três experimentos independentes.

Figura 14. Análise de western *em célula* de EGFR fosforilado (pEGFR) e EGFR nas células HN5. A mistura significa a mistura equimolar dos anticorpos 992, 1030 e 1042 a uma concentração final de 10 µg/mL, os outros anticorpos foram utilizados em uma concentração de 10 µg/mL cada. 50 µg/mL de EGF foram adicionados durante 7,5 min antes da fixação para estimular a fosforilação do EGFR. As barras de erro representam os desvios-padrão de 6 (ctlr-) ou de 3 pontos de dados separados (992, 1030, 1042, mistura ou erbitux). O 992, o 1030, a mistura e o erbitux tinham um efeito protetor significativo (* = $p<0,05$) sobre a fosforilação.

Figura 15. O efeito da incubação de anticorpos na internalização do EGFR. Os dados são mostrados como a percentagem de receptores re-

movidos da superfície celular em relação à coloração inicial. As barras de erros correspondem a SEM.

Figura 16: Curvas de crescimento de células A431-NS na presença de concentrações variáveis dos anticorpos 992, 1030 e 1042 e misturas dos mesmos que são medidas pela percentagem de células metabolicamente ativas quando comparadas ao controle não tratado. 1001 é um anticorpo não-funcional com isotipo similar utilizado como controle negativo.

Figura 17: Curvas de crescimento de células A431-NS na presença de 10 µg/mL dos anticorpos 992, 1030 e 1042 e misturas dos mesmos e concentrações variáveis do EGF ligante do EGFR que são medidas pela absorbância em 450 nm. 1001 é um anticorpo não-funcional com isotipo similar utilizado como controle negativo.

Figura 18: Curvas de crescimento de células A431-NS na presença de concentrações variáveis do anticorpo 992 e misturas do 992 e anticorpos com epitopos não-sobrepostos presentes no domínio I, II ou III. 1001 é um anticorpo não-funcional com isotipo similar utilizado como controle negativo.

Figura 19. Apoptose em células A431NS. A mistura de EGFR, os anticorpos monoclonais individuais, Erbitux e Vectibix foram testados em diluições de 10 vezes. O complexo de histona-DNA de células apoptóticas foi medido utilizando um kit de ELISA da Roche.

Figura 20. Quatro grupos de 10 camundongos Balb/C Nu/Nu nus foram inoculados com $1x10^6$ células A431NS. Quando os tumores tinham aproximadamente 100 mm^3, o tratamento foi iniciado. Os grupos foram injetados com 1 mg/mL de anticorpos cinco vezes durante o experimento como indicado com setas. Os diâmetros dos tumores foram medidos com calibres digitais. Os resultados são mostrados como o volume médio do tumor (± SEM).

Figura 21. Quando os camundongos individuais foram mortos no experimento mostrado na figura 20, os tumores foram cortados e pesados. São mostrados os valores médios ± SEM. As estrelas indicam significância em $P<0,05$.

Figura 22. Crescimento de esferoides de A431-NS na presença de 10 µg/mL dos anticorpos 1001, Erbitux, Vectibix e uma mistura de três anticorpos com epitopos não-sobrepostos 992+1030+1042. 1001 é um anticorpo não-funcional com isotipo similar utilizado como controle negativo.

Figura 23: Sequência de DNA (SEQ ID NO: 100) e de proteína (SEQ ID NO: 101) do domínio extracelular de EGFR de cinomólogos clonado do cDNA derivado da epiderme da pele do macaco cinomólogos.

Figura 24: Alinhamento da sequência de proteína obtida do ECD do EGFR de cinomólogos (SEQ ID NO: 101) com o ECD do EGFR humano (SEQ ID NO: 108) obtido no GENBANK número de acesso X00588. É também mostrada uma sequência consenso (SEQ ID NO: 109).

Figura 25: Exemplo de discriminação por ensaio de ELISA entre espécies com reação cruzada e anticorpos específicos às espécies que se ligam ao ECD do EGFR Humano ou de cinomólogos ou ambos.

Figura 26: Fotomicrografias de seções representativas de tumores de cada um dos quatro grupos experimentais de camundongos que sofreram xenoenxertos. Em um aumento de 200x, as setas apontam para os focos de diferenciação terminal de células A431 *in vivo*. Observar focos notavelmente maiores e mais numerosos de diferenciação terminal no tumor tratado com uma mistura de três clones anti-EGFR (992+1030+1042), dois painéis superiores.

Figura 27: A) Imagens feitas em um aumento de 40x de esferoides de HN5 24 horas após a adição de 10 µg/mL do anticorpo de controle. (Rituximab, anti CD-20) ou a mistura de anticorpos anti EGFR de 992 e 1024. B) Quantificação da área coberta pelas células utilizando o software Image J (* $p<0,01$).

Figura 28. Diagrama que mostra os níveis de Involucrin nos quatro grupos de tratamento na forma da percentagem do grupo de controle não tratado (*#¤$p<0,005$ quando comparado com Erbitux, Vectibix e o Grupo de controle negativo respectivamente).

Figura 29. A) Imagens feitas em aumentos de 60 x de células HN5 e A431NS incubadas com 10 µg/mL de Erbitux marcado com Alexa-488

ou 992+1024 durante 2 horas. B) Imagens feitas em aumentos de 60 x com um orifício pequeno de células A431NS incubadas com 10 µg/mL de Erbitux marcado com Alexa-488 ou 992+1024 durante 2 horas.

Figura 30. A) Imagens feitas em aumentos de 60 x de células HN5 incubadas com 10 µg/mL de Erbitux marcado com Alexa-488 ou 992+1024 durante os períodos de tempo indicados.

Figura 31: Determinação da especificidade de apresentação de antígenos de Fabs 992, 1024 & 1030 através de titulações em série de anticorpos nas células A431-NS e EGFR de comprimento completo purificado em ELISA. Os anticorpos Fab ligados foram visualizados através de um conjugado de HRP específico anti-Fab Humano de Cabra secundário. A) Anticorpos Fab testados contra o EGFR de comprimento completo purificado das células A431. B) Anticorpos Fab testados contra EGFR expresso na superfície de células A431-NS.

Figura 32: Determinação da afinidade funcional de IgG e fragmentos Fab dos anticorpos 992, 1024, 1030, Erbitux & Vectibix através da titulação em série em células A431-NS fixas em paraformaldeído em ELISA. Os anticorpos Fab e IgG ligados foram visualizados através de um conjugado de HRP específico a anti-Fab Humano de Cabra secundário. O anticorpo F antiproteína RSV Synagis foi empregado como um anticorpo de controle negativo e não exibia qualquer ligação no ensaio de ELISA empregado. A) Ligação funcional de anticorpos IgG às células A431-NS. B) Ligação funcional de anticorpos Fab às células A431-NS.

Figura 33: Determinação do aumento da ligação de IgG ao EGFR nas células A431-NS após a saturação prévia do receptor com fragmentos Fab que se ligam a epitopos que não se sobrepõem. Foi permitido que os fragmentos Fab indicados saturassem o epitopo de EGFR reconhecido nas células A431-NS durante 30 min após os quais os anticorpos IgG especificados foram titulados em série e o IgG ligado com ou sem a adição de Fab foi visualizado através de um conjugado de HRP anti-Fc Humano de Camundongo secundário. A) Características de ligação do IgG 992 às células A431-NS com ou sem a saturação prévia do receptor com fragmentos

Fab indicados. B) Características de ligação de IgG 1024 às células A431-NS com ou sem a saturação prévia do receptor com fragmentos Fab indicados. C) Características de ligação de IgG 1030 às células A431-NS com ou sem a saturação prévia do receptor com os fragmentos Fab indicados.

Figura 34: cDNA do EGFR de comprimento completo de cinomólogos (Figura 34A; SEQ ID NO: 102) e proteína codificada (figura 34B; SEQ ID NO: 103).

Figura 35: Apoptose obtida em A431NS com 1 µg/mL dos anticorpos/combinações indicados. Os complexos de Histona-DNA foram detectados em um kit de ELISA da Roche. Os níveis de apoptose foram relacionados a um controle positivo (apoptose máxima).

Figura 36: Os camundongos Balb/C nu/nu receberam injeção de $1x10^6$ células A431NS. Quando os tumores tinham uma média de aproximadamente 100 mm^3, os tratamentos foram iniciados. Os camundongos receberam 17 injeções com anticorpo. O primeiro tratamento começando no dia 8 e o último no dia 34. O anticorpo/composições foram injetados a 0,5 mg/dose ou 0,17 mg/dose. São mostrados os valores médios de volume de tumor ± SEM.

Figura 37: Inibição da proliferação de A431NS. O eixo X mostra combinações representativas diferentes de 3 anticorpos da invenção. O eixo Y mostra a atividade metabólica como a percentagem do controle não tratado (controle). As barras de erro representam ± SEM. Para detalhes adicionais vide o Exemplo 6.

Figura 38. Efeito inibidor do crescimento de duas doses diferentes da mistura de 992+1024 comparada com o Erbitux em xenoenxertos de tumor humano A431NS. Os camundongos BALB/c nu/nu foram inoculados com 10^6 células A431NS. Quando os tumores atingiram um tamanho médio de 100 mm^3 (dia 8) os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos de 9 e o tratamento foi iniciado. Os anticorpos indicados foram injetados a 0,5 mg/dose ou 1 mg/dose, duas vezes por semana ao longo de um total de 9 injeções. A área cinzenta clara no gráfico indica o período de tratamento. O início de uma linha pontilhada determina o ponto de tempo no qual o

primeiro camundongo em um certo grupo foi submetido à eutanásia devido ao tamanho de tumor excessivo. As diferenças estatisticamente significativas entre 2 mg/semana 992+1024 vs. 2 mg/semana de Erbitux e 1 mg/semana 992+1024 vs. 2 mg/semana de Erbitux foram calculadas no dia 60 em que todos exceto o grupo 992+1024 2 mg/semana foram interrompidos. O tamanho dos tumores de animais excluídos antes do dia 60 foi levado adiante, neste caso; o gráfico mostra o volume de tumor acumulado de todos os camundongos em um certo grupo. São mostrados valores médios ± SEM.

Figura 39. Representação gráfica de Kaplan-Meyer da sobrevivência de camundongos tratados com a mistura de anticorpos 992+1024, Erbitux ou anticorpo de controle (o mesmo experimento que o mostrado na Figura 38). Resultados apresentados como a percentagem de sobrevivência de camundongos tratados. Uma diferença significativa entre a percentagem de sobrevivência de camundongos nos grupos de dose alta (2 mg/semana, P = 0,0008) e de dose baixa (1 mg/semana, P = 0,0004) foi observada quando 992+1024 e Erbitux são comparados. Ainda, 992+1024 em dose baixa era significativamente melhor quando comparado com Erbitux em dose alta (P = 0,0087). A diferença estatística foi calculada utilizando um teste Log-rank (Mantel-Cox).

Figura 40: Análise da reatividade cruzada de IgGs 992, 1024 & 1320 contra células CHO transfectadas com EGFR Humano e de cinomólogos através da análise de FACS. O anticorpo ligado foi detectado com um FC de IgG anti humano $F(ab')_2$ de cabra marcado com PE. A ligação foi realizada em células uniformes (propriedades SCC/FCS) expressando EGFR. A ligação é expressa na forma da % de ligação máxima de anticorpo na concentração de 1 nM.

Figura 41: Alinhamento Clustalw2 das sequências de aminoácidos das regiões variáveis das regiões variáveis candidatas murinas (chi) e humanizadas (hu) tanto das cadeias pesadas quanto leves de 992 (A) e 1024 (B). As regiões CDR que são definidas por IMGT estão sublinhadas; os espaços ("gaps") apresentados por (-), os aminoácidos idênticos por (*), as mutações conservativas como (:), semiconservativas (.). O aminoácido em

negrito indica as posições de aminoácidos em que retromutações no resíduo murino identificado original serão realizadas se variações na estrutura humana completa exibir menor afinidade de ligação. Os números de ID de sequência são como a seguir: 992 VH Humanizada (SEQ ID NO: 104). 992 VL Humanizada (SEQ ID NO: 105). 1024 VH Humanizada (SEQ ID NO: 106). 1024 VL Humanizada (SEQ ID NO: 107). 992 VH Quimérica (aa 3-124 da SEQ ID NO: 40). 992 VL Quimérica (aa 3-109 da SEQ ID NO: 72). 1024 VH Quimérica (aa 3-120 da SEQ ID NO: 41). 1024 VL Quimérica (aa 3-114 da SEQ ID NO: 73).

Figura 42A: Representação esquemática do domínio variável dual que codifica os genes para 992L1024; 992L1024 IGHV (751 pb) é representada desde o sítio de restrição *5' Asc*I seguido por 992 IGHV, o ligador ASTKGP, 1024 IGHV e terminando no sítio de restrição 3' *Xho*I, 992L1024 IGKV (1071 pb) é representado desde o sítio de restrição *5' Nhe*I seguido por 992 IGKV, o ligador TVAAP, 1024 IGKV, IGKC e terminando no sítio de restrição 3' *Not*I.

FIGURA 42B: Representação esquemática do domínio variável dual que codifica os genes para 1024L992; 1024L992 IGHV (751 pb) é representada desde o sítio de restrição *5' Asc*I seguido por 1024 IGHV, o ligador ASTKGP, 992 IGHV e terminando no sítio de restrição 3' *Xho*I, 1024L992 IGKV (1071 pb) é representado desde o sítio de restrição *5' Nhe*I seguido por 1024 IGKV, o ligador TVAAP, 992 IGKV, IGKC e terminando no sítio de restrição 3' *Not*I.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Misturas de anticorpos

Em uma modalidade, a invenção refere-se a uma composição de anticorpos que compreende moléculas de anticorpos capazes de ligar pelo menos três epitopos de EGFR distintos, preferencialmente três epitopos não-sobrepostos de EGFR. A natureza não-sobreposta dos anticorpos é preferencialmente determinada utilizando anticorpos marcados de forma diferencial em uma análise de FACS com células que expressam EGFR ou através da utilização da Ressonância de Plasmônio de Superfície utilizando o

antígeno de EGFR capturado ou conjugado à superfície de uma célula em fluxo. Os métodos baseados em ELISA que são descritos nos exemplos também podem ser utilizados. Uma composição que se liga a três epitopos não-sobrepostos de EGFR pode ser utilizada contra uma faixa mais ampla de tipos de cânceres dependentes de EGFR uma vez que pode ser menos vulnerável às diferenças na conformação do EGFR e menos vulnerável às mutações quando comparada à composição de anticorpos monoclonais que se direcionam a um ou dois epitopos. Além disso, a composição de anticorpos que se liga a três epitopos não-sobrepostos de EGFR pode fornecer eficácia superior comparada à composição que se direciona a menos epitopos. Em particular, a composição de anticorpos pode fornecer eficácia superior em relação à diferenciação terminal de células cancerosas *in vivo*. A Figura 37 mostra vários exemplos de composições de anticorpos potentes que se ligam a três epitopos de hEGFR distintos ilustrando a aplicabilidade geral do conceito.

Para uma terapia com anticorpo monoclonal anti-EGFR, uma certa proporção de pacientes não responderá eficientemente ao tratamento com anticorpo. Para alguns dos pacientes, isto pode ser devido à rápida eliminação do anticorpo ou devido ao fato de que o anticorpo gera uma resposta imunológica no paciente contra o anticorpo. Para alguns pacientes, a ausência de resposta pode ser devida ao seu câncer dependente de EGFR particular que expressa EGFR em uma conformação em que o anticorpo monoclonal não pode se ligar ao seu epitopo. Isto poderia ser devido às diferenças na glicosilação, devido à deleção de domínios ou devido a mutações e/ou SNP(s).

Ainda para alguns cânceres, a estimulação de EGFR autócrino causada pela produção das células cancerosas de ligante tem importância, enquanto que em outros casos o EGFR expresso pelas células cancerosas não precisa de estímulo por ligante. Para os últimos tipos de cânceres, um anticorpo capaz de inibir a ligação ao ligante pode não ser eficiente.

Uma composição de anticorpos em que os anticorpos são capazes de se ligar a pelo menos três epitopos distintos no EGFR será mais am-

plamente aplicável, uma vez que a probabilidade de que todos os três epitopos estejam alterados comparada com a do(s) epitopo(s) reconhecido(s) pelos anticorpos é diminuída. Além disso, a probabilidade de que todos os anticorpos sejam cada um eliminado pelo paciente é muito menor. Finalmente, os exemplos mostram que em ensaios funcionais, uma mistura que compreende três anticorpos que se ligam a epitopos distintos é superior a um anticorpo monoclonal e a uma mistura que compreende dois anticorpos. A superioridade foi mostrada mais claramente em termos da indução da diferenciação terminal das células cancerosas utilizando três anticorpos para o Domínio III com epitopos não-sobrepostos. Tal diferenciação terminal induzida eficiente por anticorpo de células cancerosas não foi relatada anteriormente e representa uma etapa significativa em direção ao planejamento de terapias para câncer baseadas em anticorpos. Os últimos resultados mostraram que resultados similares ou até mesmo superiores podem ser obtidos com uma combinação particular de dois anticorpos.

Para maior eficiência clínica e utilidade mais extensa contra uma faixa mais ampla de tipos de cânceres dependentes de EGFR, o número de anticorpos na composição pode ser aumentado. Assim, a composição pode compreender anticorpos capazes de se ligar a quatro epitopos não-sobrepostos. A composição pode compreender anticorpos capazes de se ligar a cinco epitopos não-sobrepostos. A composição pode compreender anticorpos capazes de se ligar a seis epitopos não-sobrepostos. Os exemplos do presente pedido de patente mostram que pelo menos seis anticorpos distintos podem se ligar a EGFR de uma vez (Exemplo 3). Isto não exclui que é possível ou ainda vantajoso planejar uma composição que compreende anticorpos capazes de se ligar a mais de seis, tal como sete ou oito epitopos não-sobrepostos através da seleção cuidadosa dos anticorpos.

Em uma outra modalidade, a composição compreende mais de uma molécula de anticorpo que se liga a um epitopo, tal como dois anticorpos que se ligam a epitopos sobrepostos, mas diferentes. Pode haver vantagens de incluir anticorpos com epitopos sobrepostos uma vez que isto aumenta a probabilidade do epitopo ser ligado. Um fundamento lógico por trás

disso é que o epitopo em alguns pacientes e/ou em algumas células cancerosas pode ser alterado devido às alterações conformacionais ou mutações ou SNPs. Embora isto possa afetar a ligação de um anticorpo, pode não afetar a ligação de um outro anticorpo que se liga a um epitopo sobreposto. Além disso, há um risco de que um dos anticorpos seja eliminado pelos pacientes, porque este é visto como um antígeno. Incluindo dois anticorpos que se ligam a epitopos sobrepostos, mas diferentes, a consequência da eliminação de um dos dois anticorpos e a consequência de uma mutação em um epitopo são diminuídas.

Assim, em uma modalidade, a composição compreende dois anticorpos que se ligam a epitopos sobrepostos, mas diferentes. Em uma outra modalidade a composição compreende duas moléculas de anticorpos distintas que se ligam ao mesmo epitopo. Os anticorpos que se ligam ao mesmo ou a epitopos sobrepostos podem ser do mesmo ou de um isotipo diferente.

Uma composição de anticorpos que compreende anticorpos direcionados contra três epitopos não-sobrepostos pode assim compreender quatro, cinco ou seis moléculas de anticorpos distintas de forma que dois anticorpos se ligam a dois epitopos sobrepostos ou ao mesmo primeiro epitopo, dois outros anticorpos se ligam a dois outros epitopos sobrepostos ou ao mesmo segundo epitopo e dois anticorpos se ligam a dois outros epitopos sobrepostos adicionais ou ao mesmo terceiro epitopo. Evidentemente, a composição pode compreender mais de duas, tal como três ou quatro moléculas de anticorpos capazes de se ligar a epitopos sobrepostos ou capazes de se ligar ao mesmo epitopo. Assim, o número total de anticorpos incluídos na composição pode exceder 6 por possuir mais de um anticorpo para cada epitopo ou por possuir vários anticorpos com epitopos sobrepostos. Mantendo a dosagem total de anticorpo constante, para cada anticorpo adicional incluído na composição, a concentração de cada anticorpo diminui. Portanto, é esperado que haja um limite no número de anticorpos que podem ser incluídos em uma composição enquanto é mantida uma eficácia aceitável. Com base nas observações provenientes dos estudos de ligação por Res-

sonância de Plasmônio de Superfície e dos ensaios de proliferação e levando em consideração os desafios da produção, é esperado que a vantagem adicional limitada (se alguma) pode ser obtida através do aumento do número de anticorpos de 6 até 7, 8, 9, 10 ou mais. Evidentemente, isto não exclui o fato de que a composição compreende mais de 10 anticorpos, tal como 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 anticorpos ou mais, tal como 25 anticorpos ou mais, por exemplo, 30 anticorpos ou mais, tal como 40 anticorpos ou mais, tal como 50 anticorpos ou mais.

Embora seja preferido incluir em uma composição de anticorpos da invenção, anticorpos capazes de se ligar a pelo menos três epitopos não-sobrepostos de EGFR, resultados superiores também foram obtidos com combinações específicas de anticorpos capazes de se ligar a dois epitopos não-sobrepostos de EGFR. Estas composições preferidas de "dois anticorpos" são descritas em maiores detalhes a seguir junto com a orientação em relação a como planejar as composições de anticorpos da invenção. Foi descoberto que comparada com a composição de três anticorpos que compreende os anticorpos 992, 1030 e 1042, uma eficácia similar ou até mesmo maior poderia ser obtida quando era utilizada uma composição com apenas dois anticorpos: 992 e 1024. Uma vez que os anticorpos 1024 e 1042 pertencem ao mesmo grupo e, portanto, possuem a mesma especificidade de ligação, realmente, os resultados observados para a composição de três anticorpos incluindo o efeito sobre a diferenciação terminal podem ser atribuídos a apenas duas das especificidades de ligação (992 e 1024/1042) na composição.

Em uma modalidade pelo menos um anticorpo na composição se liga a um epitopo do domínio III, mais preferencialmente a composição compreende pelo menos dois anticorpos que se ligam a epitopos do domínio III e a composição pode também compreender três anticorpos que se ligam a epitopos do domínio III.

Preferencialmente, a composição compreende pelo menos um anticorpo que se liga a um epitopo do domínio I e pode compreender pelo menos dois anticorpos que se ligam a epitopos do domínio I.

Preferencialmente, a composição compreende pelo menos um anticorpo que se liga a um epitopo do domínio II e pode compreender anticorpos que se ligam a dois epitopos do domínio II.

A composição pode também compreender um anticorpo que se liga a um epitopo do domínio I/II como definido aqui.

A composição pode compreender um anticorpo capaz de se ligar a um epitopo do domínio IV.

Preferencialmente, a composição compreende pelo menos uma molécula de anticorpo capaz de inibir a ligação ao EGF.

Em uma outra modalidade preferida, a composição pode compreender um anticorpo capaz de prevenir a fosforilação de EGFR.

Além disso, a composição pode compreender um anticorpo capaz de aumentar a internalização/degradação de EGFR.

Em uma modalidade preferida, a composição compreende pelo menos um anticorpo para o domínio III e pelo menos um anticorpo para o domínio I/II. Em uma outra modalidade preferida, a composição compreende pelo menos dois anticorpos para o domínio III e um anticorpo para o domínio I.

Em uma modalidade preferida adicional, a composição compreende pelo menos dois anticorpos para o domínio III, tal como pelo menos três anticorpos para o domínio III.

Os anticorpos da composição podem ser anticorpos quiméricos com cadeias variáveis não-humanas e cadeias constantes humanas. As cadeias variáveis não-humanas podem ser de camundongo, rato, ovelha, porco, frango, primata não-humano ou outro animal adequado. Para a obtenção de anticorpos completamente humanos, os anticorpos podem ser gerados em um animal transgênico com genes de anticorpos humanos. Os anticorpos também podem ser os assim chamados anticorpos humanizados, em que as sequências CDR não-humanas foram enxertadas em sequências estruturais humanas.

Preferencialmente a cadeia constante humana é do isotipo IgG1 ou IgG2. Mais preferencialmente todos os anticorpos na composição possu-

em o mesmo isotipo para facilitar a produção. Entretanto, pode ser vantajoso incluir na composição anticorpos de isotipo diferente.

Preferencialmente as composições de anticorpos da invenção compreendem anticorpos capazes de se ligar a EGFR selecionado do grupo que consiste em EGFR humano, EGFR humano mutado e variações de deleção de EGFR humano. Preferencialmente os anticorpos são capazes de se ligar ao EGFR tanto humano quanto de primata sem ser humano, de forma que podem ser testados em estudos toxicológicos relevantes antes dos experimentos clínicos. Preferencialmente, o primata não-humano é o macaco cinomólgo (*Macaca fascicularis*).

Para apoiar o conceito identificado anteriormente de tratamento de câncer dependente de EGFR utilizando anticorpos que se ligam a três de mais epitopos distintos, os presentes inventores identificaram, produziram e caracterizaram uma série de anticorpos quiméricos de camundongo/ser humano direcionados contra o EGFR. Estes anticorpos quiméricos foram comparados individualmente e em misturas de anticorpos monoclonais do estado da técnica, exemplificados por Erbitux® e Vectibix®.

A Tabela 1 mostra um sumário dos anticorpos quiméricos individuais e as características associadas aos mesmos. O número do anticorpo é um número de referência utilizado ao longo de todo o presente pedido de patente. A especificidade é o domínio de EGFR ao qual o anticorpo se liga como é evidenciado no Exemplo 3. deltaEGFR é a capacidade do anticorpo se ligar ao mutante de EGFR (EGFRvIII) como descrito no exemplo 1. O EGFR de Cinomólgo é a capacidade do anticorpo de se ligar ao EGFR de cinomólgo (exemplo 10). EGF inhib é a capacidade do anticorpo de inibir a ligação do EGF (Exemplo 4). Proliferação é a capacidade do anticorpo de inibir a proliferação de linhagens de células cancerosas, A431 e HN-5 (Exemplo 6).

Tabela 1. Anticorpos da invenção

Anticorpo Nº	Especificidade	deltaEGFR	EGFR de Cinomólgo	EGF inhib	Proliferação
992	Domínio III	não/fraca	sim	sim/fraca	sim
1030	Domínio III	sim	sim	sim	sim
1024	Domínio III	sim	sim		sim
1042	Domínio III	fraca	sim	(sim)	sim
1277	Domínio III	sim	Sim	sim	HN5
1254	Domínio III	sim	Sim	sim	HN5
1208	Domínio III	sim	sim	sim	sim HN5±992
1320	Domínio III	fraca	não	sim	sim
1257	Domínio I/II	não	sim	não	sim
1261	Domínio I	não	Sim	não	sim
1229	Não o domínio I/II	sim	não	não	sim (A431)
1284	Domínio I	não	Sim	sim	sim
1344	Domínio I/II	não	sim	nd	HN5 w/992
1260	Domínio I/II	não	Sim	sim	A431
1308	Domínio I	não	sim	nd	HN5 w/992
1347	Domínio I	não	sim	nd	HN5 w/992
1428	Domínio I & II	não	Sim	sim	HN5 w/992

Partindo dos dados gerados com os anticorpos quiméricos testados isoladamente e em combinação nos ensaios de proliferação, ligação, degradação/inativação do receptor e motilidade e em modelos de animais, pode ser tirado um número de conclusões.

Os resultados obtidos com duas linhagens de células cancerosas, HN-5 e A431 (Exemplo 6) foram repetidos com linhagens de células cancerosas diferentes (MDA-MB-468 uma linhagem de células de câncer de mama; DU145 - linhagem de células de câncer de próstata). O que é evidente partindo destes experimentos é que combinações de anticorpos fornecidas pelos presentes inventores exibem eficácia contra uma faixa muito ampla de linhagens de células cancerosas, apoiando a eficácia das composições de anticorpos contra uma faixa de conformações de EGFR.

Também foi mostrado que a superioridade de misturas de anticorpos é maior nos ensaios de proliferação em que concentrações fisiológi-

cas de ligante (EGF) são adicionadas no meio de cultura do que quando o EGF não é adicionado (Figura 17). De acordo com a literatura (Hayashi e Sakamoto 1998 J Pharmacobiodyn 11;146-51) o soro contém aproximadamente 1-1,8 ng/mL ou 0,2-0,3 nM de EGF enquanto que é relatado que o suco gástrico contém 0,3 ng/mL (cerca de 0,05 nM) (Pessonen e outros 1987 Life Sci. 40; 2489-94). Em um arranjo *in vivo*, é provável que o EGF e outros ligantes de EGFR estejam presentes e a capacidade da mistura de anticorpos ser eficiente na presença do ligante de EGFR é, portanto, uma característica importante das misturas de anticorpos da presente invenção.

Os anticorpos quiméricos de camundongo/ser humano da presente invenção fornecem melhores resultados quando utilizados em combinação do que quando utilizados isoladamente. Isto é exemplificado em vários experimentos (vide, por exemplo, o Exemplo 6)), em que os anticorpos quando testados isoladamente exibem apenas efeitos antiproliferativos moderados sobre uma linhagem de células cancerosas (A431-NS), mas quando utilizados em qualquer combinação, exibem resultados notavelmente superiores. Estes resultados foram confirmados com várias combinações dos anticorpos quiméricos da presente invenção. Resultados particularmente superiores foram obtidos com uma composição que compreende os anticorpos 992 e 1024.

Por exemplo, vários dos anticorpos foram testados em um ensaio antiproliferação com A431-NS e HN-5 junto com qualquer dos Anticorpos 992, 1208, 1254 e 1277.

Estudos de ligação ao receptor mostraram que alguns anticorpos podem realmente estimular a ligação de anticorpos adicionais, de forma que um anticorpo particular se ligue em quantidades maiores ao receptor após a saturação do receptor com um ou vários anticorpos. A ligação do anticorpo 992, direcionado contra o domínio III, se benificia claramente deste efeito sinérgico obtido através da saturação prévia do receptor com um ou mais anticorpos que se ligam a epitopos não-sobrepostos. Um outro exemplo deste efeito cooperativo é observado quando o anticorpo 1396 direcionado contra um epitopo desconhecido é testado contra EGFR saturado com

anticorpos que se ligam a epitopos não-sobrepostos.

Estudos de ligação ao receptor também mostraram que é possível ligar pelo menos 6 anticorpos ao domínio extracelular de EGFR simultaneamente. Estes 6 anticorpos representam 3 anticorpos para o Domínio III, um anticorpo para o Domínio I, um anticorpo para o Domínio I/II e um anticorpo que se liga a um epitopo desconhecido. De forma interessante, a ligação dos três anticorpos para o Domínio III parece facilitar a ligação subsequente de anticorpos adicionais. Isto sustenta claramente o conceito de fornecer composições de anticorpos com vários anticorpos que se ligam a epitopos distintos.

Quando a composição de uma composição de anticorpos contra EGFR é planejada, os anticorpos com epitopos não-sobrepostos são preferencialmente utilizados uma vez que estes fornecem um efeito sinérgico maior.

É também preferível que pelo menos um dos anticorpos da mistura (quando testado isoladamente) seja capaz de inibir a ligação do ligante ao EGFR, por exemplo, capaz de inibir a ligação ao EGF e/ou capaz de inibir a ligação ao TGFalfa e/ou capaz de inibir a ligação à anfirregulina. Preferencialmente o anticorpo capaz de inibir a ligação ao EGF é selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 992, 1030, 1024, 1042, 1208, 1254, 1277, 1284, 1320 e 1428, mais preferencialmente do grupo que consiste nos anticorpos 1208, 1260, 1277 e 1320.

É similarmente preferível que pelo menos um membro de anticorpo na mistura de anticorpos seja capaz de reduzir a fosforilação do EGFR. Os exemplos de anticorpos da invenção com esta propriedade incluem: 992, 1030, 1042, 1208, 1277 e 1320.

O Domínio III do EGFR tem importância para a ligação do ligante ao receptor. Além disso, o anticorpo que se liga ao Domínio III pode estabilizar o EGFR na conformação monomérica restrita, que não leva à sinalização do receptor. Por estas razões é preferível que a composição de anticorpos contenha pelo menos um anticorpo com especificidade em relação ao Domínio III. Os anticorpos preferidos para o Domínio III incluem os anti-

corpos 992, 1024, 1030, 1208, 1254, 1277 e 1320. Mais preferencialmente o pelo menos um anticorpo para o domínio III é selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 992, 1254, 1277, 1208 e 1320. A composição de anticorpos pode preferencialmente compreender mais de um anticorpo para o Domínio III anticorpo tal como pelo menos 3 anticorpos para o domínio III, por exemplo, pelo menos 4 anticorpos para o domínio III, tal como pelo menos 5 anticorpos para o domínio III, por exemplo, pelo menos 6 anticorpos para o domínio III.

Em uma outra modalidade preferida, a composição de anticorpos compreende pelo menos um anticorpo para o Domínio I. Preferencialmente o pelo menos um anticorpo para o Domínio I é selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 1284, 1308, 1344 e 1347. Mais preferencialmente o pelo menos um anticorpo para o Domínio I é selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 1284 e 1347.

Em uma outra modalidade preferida, a composição de anticorpos compreende pelo menos um anticorpo para o Domínio I/II. Preferencialmente o pelo menos um anticorpo para o Domínio I/II é selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 1257, 1260, 1261, 1428 e 1434. Mais preferencialmente o pelo menos um anticorpo para o Domínio I/II é selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 1261 e 1260.

As combinações específicas eficientes de dois anticorpos da presente invenção incluem:

O anticorpo 1280 junto com 1024, 1320, 1308, 1284, 1260 ou 1030, preferencialmente com 1320 ou 1284.

O anticorpo 1254 junto com 1024, 1030, 1260, 1284, 1308 ou 1320, preferencialmente com 1320, 1284 ou 1260.

O anticorpo 1277 junto com 1024, 1030, 1260, 1284, 1308 ou 1320, preferencialmente com 1320, 1284 ou 1260.

O anticorpo 992 junto com 1030, 1260, 1284, 1308, 1320 ou 1024, preferencialmente com 1320, 1024 ou 1284.

Os exemplos de misturas superiores e preferidas de dois anticorpos incluem 992+1024; 992+1320; 992+1042; 1277+1320; 1208+1320. É

particularmente preferida a 992+1024.

As misturas preferidas com três anticorpos incluem: Anticorpos 992+1030+1042; 992+1320+1024; 992+1024+1030; 1320+1284+1261; 1320+1214+1320; 992+1284+1320; 992+1255+1024; 992+1030+1320; 992+1024+1214; 992+1261+1320; 992+1024+1284; 992+1024+1211; 992+1024+1030; 1260+1214+1254; 992+1255+1320; 992+1211+1320; 992+1030+1261; 992+1260+1030; 992+1260+1320; 992+1030+1214.

As misturas preferidas com quatro anticorpos incluem: Anticorpos 992+1320+1024+1030; 992+1024+1030+1284; 1277+1320+1260+1347; 1277+1320+1261+1347; 1277+1320+1261+1284; 1254+1320+1260+1347; 1254+1320+1261+1347; 1254+1320+1261+1284; 1254+1024+1260+1347; 1254+1024+1261+1347; 1254+1024+1261+1284; 1277+1024+1260+1347; 1277+1024+1261+1347; 1277+1024+1261+1284.

As misturas preferidas com 5 anticorpos incluem: 992+1030+1024+1260+1347; 992+1030+1024+1261+1347; 992+1030+1024+1261+1284; 992+1030+1320+1260+1347; 992+1030+1320+1261+1347; 992+1030+1320+1261+1284;

Uma mistura preferida com 8 anticorpos inclui: 992+1030+1024+1277+1254+1320+1260+1261+1284+1347.

Além disso, para possibilitar a realização de um estudo toxicológico em um primata não-humano, é preferível que todos os anticorpos na composição se liguem a EGFR humano assim como a pelo menos um de primata adicional, tal como o EGFR de chimpanzé, de *Macaca mulatta*, de macaco Rhesus e de outros macacos ou macaco cinomólgo. O macaco cinomólgo é um animal relativamente pequeno e muito bem adequado para estudos toxicológicos, portanto, o EGFR de primata adicional é preferencialmente EGFR de cinomólgo. Preferencialmente os anticorpos se ligam com aproximadamente a mesma afinidade ao EGFR humano e de primata não-humano.

A presente invenção mostrou resultados superiores em um ou mais ensaios funcionais quando 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 anticorpos foram combinados em uma composição. Embora estes dados forneçam uma orientação

na seleção do número de anticorpos na composição, estes estão atualmente de uma maneira que é interpretada de uma forma limitante. A composição pode compreender mais de 8 anticorpos, muito embora os dados experimentais exibam apenas a ligação simultânea de 6 anticorpos. Pode haver outras razões para incluir mais de 6 anticorpos na composição, tal como, por exemplo, diferenças na taxa de eliminação dos membros de anticorpos.

Uma característica preferida adicional dos anticorpos das composições é a homogeneidade das proteínas, de forma que os anticorpos podem ser purificados facilmente. Para os membros de anticorpos individuais, um perfil cromatográfico por troca iônica com um pico distinto é preferido para facilitar a caracterização. Um perfil cromatográfico por troca iônica claro é também preferido para facilitar a caracterização da composição de anticorpos final. Este também é preferível quando são combinados os anticorpos que podem ser distinguidos utilizando cromatografia por troca iônica, de forma que a composição com todos os anticorpos possa ser caracterizada em uma rodada.

Os anticorpos podem ter qualquer origem tal como humana, murina, de coelho, frango, porco, lhama, ovelha. Os anticorpos também podem ser quiméricos como descrito nos exemplos ou podem ser versões humanizadas, super-humanizadas ou remoldadas dos mesmos utilizando métodos bem-conhecidos descritos na técnica.

Uma composição de anticorpos preferida

Como mostrado nos exemplos anexados, a composição anti-EGFR baseada nos anticorpos 992 e 1024 possui propriedades únicas e distintas. A ligação do anticorpo 992 é aumentada através da ligação de outros anticorpos incluindo 1024. Em contraste aos anticorpos comerciais, tanto 992 quanto 1024 se ligam preferencialmente a epitopos conformacionais apresentados nas células (Exemplos 14 e 15). Ambos os epitopos de 992 e 1024 se sobrepõem, mas são distintos do(s) epitopo(s) de Erbitux e Vectibix. Em contraste a um número de outras composições de dois anticorpos em que os anticorpos individuais se ligam a epitopos não-sobrepostos, a composição baseada nas especificidades de ligação dos anticorpos 992 e 1024

ativa a internalização do receptor rapidamente e eficientemente. Um novo mecanismo de ação que envolve a diferenciação terminal acompanhada pela maior expressão da involucrina e do aparecimento de pérolas de queratina é observado em um modelo animal após o tratamento com composições de anticorpos baseadas nos anticorpos 992 e 1024. Este mecanismo de ação exclusivo leva à inibição de crescimento mais eficiente e prolongada *in vitro* e *in vivo*. Isto é mais claramente observado nos exemplos *in vivo* em que os tumores continuam a diminuir após o término do tratamento. No grupo de controle que recebe Erbitux, os tumores começam a crescer logo após o término do tratamento. Isto indica claramente um mecanismo de ação diferente.

Acredita-se que o novo mecanismo de ação é atingido através da utilização da combinação de duas especificidades de ligação exibidas pelos anticorpos 992 e 1024 em uma composição de anticorpos. Este mecanismo de ação é também observado quando um terceiro anticorpo que não compete com os anticorpos 992 e 1024 é utilizado, por exemplo, na combinação tripla dos anticorpos 992, 1024 e 1030.

Estas observações levaram ao planejamento de uma composição de anticorpos que compreende pelo menos 2 moléculas de anticorpo anti-EGFR humano distintas, em que uma primeira molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 992, um anticorpo que compreende as sequências VL (aminoácidos 3-109 da SEQ ID NO: 72) e VH (aminoácidos 3-124 da SEQ ID NO: 40) do anticorpo 992, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 992 (SEQ ID NO: 116 e 111), um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 992 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 992 ao EGFR humano; e em que uma segunda molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências VL (aminoácidos 3-114 da SEQ ID NO: 73) e VH (aminoácidos 3-120 da SEQ ID NO: 41) do anticorpo 1024, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1024 (SEQ ID NO: 120 e 114), um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 1024 e um anticorpo capaz de inibir a

ligação do anticorpo 1024 ao EGFR humano.

Preferencialmente, a dita primeira molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 992, um anticorpo que compreende as sequências VL e VH do anticorpo 992, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 992 e um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 992; e a dita segunda molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências VL e VH do anticorpo 1024, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1024 e um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 1024.

A presente invenção estuda mutações nas sequências CDR3 dos anticorpos 992 e 1024 para fornecer anticorpos com a mesma especificidade de ligação. Portanto, em uma modalidade, um anticorpo que possui a mesma especificidade de ligação que o anticorpo 992 compreende uma CDRH3 que possui a fórmula a seguir: $CTX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}W$ em que X_1 até X_{15} são selecionados individualmente dos grupos de aminoácidos listados a seguir

X_1 = R ou K;

X_2 = N, D e ou Q;

X_3 = G, A, V ou S;

X_4 = D, E, N ou Q;

X_5 = Y, F, W ou H;

X_6 = Y, F, W ou H;

X_7 = V, I, L ou A;

X_8 = S, T, G ou A;

X_9 = S, T, G ou A;

X_{10} = G, A, V ou S;

X_{11} = D, E, N ou Q;

X_{12} = A, G, V ou S;

X_{13} = M, L, I ou V

X_{14} = D ou E; e

X_{15} = Y ou F;

e uma CDRL3 descrita pela fórmula a seguir: $CX_1X_2X_3X_4X_5X_6$ PPTF em que X_1 até X_6 são selecionados individualmente dos grupos de aminoácidos listados a seguir:

X_1 = Q ou H;

X_2 = H e ou Q;

X_3 = Y, F, W ou H;

X_4 = N, Q ou H;

X_5 = T, S, G ou A; e

X_6 = V, I, L ou A.

Em uma modalidade, um anticorpo que possui a mesma especificidade de ligação que o anticorpo 1024 compreende uma CDRH3 que possui a fórmula a seguir: $CVX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}W$ em que X_1 até X_{11} são selecionados individualmente dos grupos de aminoácidos listados a seguir

X_1 = R ou K;

X_2 = Y, F, W ou H;

X_3 = Y, F, W ou H;

X_4 = G, A, V ou S;

X_5 = Y, F, W ou H;

X_6 = D, E, N ou Q;

X_7 = E ou D;

X_8 = A, G, V ou S;

X_9 = M, L, I ou V;

X_{10} = D, E, N ou Q; e

X_{11} = Y ou F;

e uma CDRL3 descrita pela fórmula a seguir: $CX_1X_2X_3X_4X_5\ X_6PX_7TF$ em que X_1 até X_7 são selecionados individualmente dos grupos de aminoácidos listados a seguir:

X_1 = A, G ou V;

X_2 = Q ou H;

X_3 = N, Q ou H;

X_4 = L, I, M ou V;

X_5 = E, D, N ou Q;

X_6 = L, I, M ou V; e

X_7 = Y, F, W ou H.

Os anticorpos com CDR3s mutadas podem ser produzidos utilizando técnicas padronizadas e ser expressos e testados em relação à ligação utilizando métodos descritos aqui.

Os anticorpos de acordo com este aspecto da invenção podem ser quiméricos, humanos, humanizados, remoldados ou super-humanizados. Isto pode ser feito utilizado métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, os anticorpos 992 e 1024 podem ser humanizados utilizando métodos descritos no Exemplo 18. Os métodos para a "super-humanização" são descritos na US 6.881.557.

Mais preferencialmente, a dita primeira molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 992, um anticorpo que compreende as sequências VL e VH do anticorpo 992 e um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 992; e a dita segunda molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências VL e VH do anticorpo 1024 e um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1024.

Mais preferencialmente a dita primeira molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 992 e um anticorpo que compreende as sequências VL e VH do anticorpo 992; e a dita segunda molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1024 e um anticorpo que compreende as sequências VL e VH do anticorpo 1024.

Mais preferencialmente a composição compreende os anticorpos 992 e 1024.

Como descrito, os primeiro e segundo anticorpos anti-EGFR preferencialmente não inibem a ligação ao EGFR humano de cada outro. Ainda mais preferencialmente, pelo menos um dos anticorpos é capaz de aumentar a capacidade de ligação máxima do outro anticorpo em relação ao EGFR humano. Este efeito é observado para os anticorpos 992 e 1024 (Exemplo 16).

A proporção entre os dois anticorpos não precisa ser exatamente uma proporção de 1:1. Consequentemente, a proporção do primeiro anticorpo em relação ao segundo anticorpo na composição pode estar entre 5 e 95%, tal como entre 10 e 90%, preferencialmente entre 20 e 80%, mais preferencialmente entre 30 e 70, mais preferencialmente entre 40 e 60, tal como entre 45 e 55, tal como aproximadamente 50%.

Preferencialmente os primeiro e segundo anticorpos são do isotipo IgG1 ou IgG2.

Os exemplos de anticorpos que se ligam ao mesmo epitopo que o anticorpo 992 identificados pelos presentes inventores são anticorpos do grupo de anticorpos que compreende os clones 1209, 1204, 992, 996, 1033 e 1220.

Os exemplos de anticorpos que se ligam ao mesmo epitopo que o anticorpo 1024 identificados pelos presentes inventores são anticorpos do grupo de anticorpos que compreende os clones 1031, 1036, 1042, 984, 1024, 1210, 1217, 1221 e 1218.

A CDR3 determina a especificidade de ligação dos anticorpos. Em modalidades preferidas, o anticorpo que compreende a CDR3 do anticorpo 992 compreende adicionalmente a CDR1 e a CDR2 da VH e da VL do anticorpo 992. Similarmente, o anticorpo que compreende a CDR3 do anticorpo 1024 preferencialmente compreende adicionalmente a CDR1 e a CDR2 da VH e da VL do anticorpo 1024. As sequências CDR dos anticorpos podem ser encontradas na Tabela 12, exemplo 17.

Em outras modalidades, o anticorpo que compete com o anticorpo 992 é selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 1208, 1254 e 1277. Similarmente, o anticorpo que compete com o anticorpo 1024 pode ser selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 1042 e 1320.

Em uma modalidade, a composição não contém anticorpos adicionais em adição aos ditos primeiro e secundo anticorpos, mais preferencialmente não anticorpos anti-EGFR adicionais.

Em outras modalidades, a composição compreende ainda um terceiro anticorpo anti-EGFR distinto, em que a dita terceira molécula de an-

ticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1030, um anticorpo que compreende as sequências VL (aminoácidos 3-113 da SEQ ID NO: 74) e VH (aminoácidos 3-120 da SEQ ID NO: 42) do anticorpo 1030, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1030 (SEQ ID NOs 112 e 119), um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 1030 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 1030 ao EGFR humano. O dito terceiro anticorpo resulta preferencialmente em uma maior ligação ao EGFR humano do dito primeiro e/ou segundo anticorpo. Em uma modalidade, a composição não contém anticorpos adicionais em adição ao primeiro, ao segundo e ao terceiro anticorpos, mais preferencialmente não anticorpos anti-EGFR adicionais.

O anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 1030 pode ser selecionado do grupo de anticorpos que consiste nos clones 1195, 1030, 1034, 1194, 980, 981, 1246 e 1223.

O anticorpo que compreende a CDR3 do anticorpo 1030 pode compreender adicionalmente a CDR1 e a CDR2 da VH e da VL do anticorpo 1030.

Os anticorpos podem ser formulados em um recipiente para administração. Entretanto, podem ser produzidos, purificados e caracterizados individualmente e ser fornecidos em dois ou três recipientes separados na forma de um kit de partes, com um anticorpo em cada recipiente. Desta maneira, estes podem ser administrados simultaneamente, sucessivamente ou separadamente.

Em um aspecto adicional as duas especificidades de ligação dos anticorpos 992 e 1024 são combinadas em uma molécula de ligação biespecífica. Preferencialmente, a molécula de ligação biespecífica compreende as CDRs dos anticorpos 992 e 1024, mais preferencialmente as sequências VH e VL dos anticorpos 992 e 1024. A molécula de ligação biespecífica pode ser um anticorpo de domínio variável dual como descrito no exemplo 19. Uma molécula de ligação biespecífica também pode ser planejada na forma de um fragmento Fab biespecífico, um scFV biespecífico ou um diacorpo como descrito in literatura.

As composições de anticorpos baseadas nas especificidades de ligação dos anticorpos 992 e 1024 levam preferencialmente a uma ou mais da internalização do receptor, à regressão de tumores A431NS *in vivo*, à indução da diferenciação terminal em células A431NS *in vivo* e à regulação para mais da expressão da involucrina do tumor *in vivo*.

O presente pedido de patente fornece vários exemplos de anticorpos que possuem os mesmos efeitos ou similares que os da combinação de anticorpos 992 e 1024. Os exemplos destes incluem os anticorpos obtidos da mesma imunização e que pertencem aos mesmos grupos e anticorpos que competem individualmente com um dos dois anticorpos. As composições de anticorpos com o mesmo efeito ou similar podem ser planejadas com base nas sequências VL e VH dos anticorpos 992 e 1024 e também com base nas CDRs destes anticorpos, em particular, as CDR3s dos dois anticorpos.

Composições de anticorpos adicionais com os mesmos efeitos ou similares podem ser produzidas através da realização da imunização e da verificação essencialmente como descrito nos exemplos. Os anticorpos com a mesma especificidade de ligação que o anticorpo 992 e 1024 podem ser identificados em dois ensaios de competição separados como descrito aqui. Finalmente, as composições de anticorpos em que um anticorpo aumenta a ligação do outro anticorpo podem ser identificadas através da realização de experimentos de ligação essencialmente como descrito no Exemplo 16. As composições de anticorpos podem ser adicionalmente verificadas como descrito nos exemplos em relação aos efeitos sobre a internalização do receptor, à eficácia *in vitro* e *in vivo*, à afinidade de ligação etc.

Usos das composições de anticorpos da invenção

Para o uso no tratamento *in vivo* e na prevenção de doenças relacionadas com a expressão do EGFR (por exemplo, superexpressão), os anticorpos da invenção são administrados aos pacientes (por exemplo, indivíduos humanos) em dosagens terapeuticamente eficientes (por exemplo, dosagens que resultam na inibição do crescimento, fagocitose, redução de motilidade, diferenciação terminal e/ou morte de células tumorais que ex-

pressam EGFR) utilizando qualquer via de administração adequada, tal como injeção e outras vias de administração conhecidas na técnica para produtos clínicos baseados em anticorpos.

As doenças típicas relacionadas ao EGFR que podem ser tratadas, melhoradas e/ou prevenidas utilizando os anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitadas a doenças autoimunes e cânceres. Por exemplo, os cânceres que podem ser tratados, melhorados e/ou prevenidos incluem câncer da bexiga, de mama, uterino/cervical, de cólon, renal, de ovário, de próstata, de célula renal, de pâncreas, de cólon, de reto, de estômago, de célula escamosa, pulmonar (de célula não-pequena), de esôfago, de cabeça e pescoço, de pele. As doenças autoimunes que podem ser tratadas incluem, por exemplo, psoríase.

Ainda em uma outra modalidade, a invenção refere-se a um método para o tratamento, a melhoria e/ou a prevenção de glioblastoma, incluindo glioblastoma multiforme; astrocitoma, incluindo astrocitoma infantil; glioma; neuroblastoma; tumores neuroendócrinos do trato gastrointestinal; carcinoma bronquioalveolar; sarcoma de células dentríticas foliculares; carcinoma de glândula salivar; ameloblastoma; tumor maligno de bainha do nervo periférico; tumores pancreáticos endócrinos; ou tumores de células germinativas de testículo, incluindo seminoma, carcinoma embrionário, tumor de saco vitalino, teratoma e coriocarcinoma.

Isolamento e seleção de pares codificadores de cadeias pesadas variáveis e de cadeias leves variáveis

O processo de produção de uma composição de anticorpos recombinantes anti-EGFR envolve o isolamento de sequências que codificam cadeias pesadas variáveis (V_H) e cadeias leves variáveis (V_L) partindo de uma fonte adequada, gerando assim um repertório de pares codificadores de V_H e V_L. Geralmente, uma fonte adequada para a obtenção de sequências codificadoras de V_H e V_L são frações de células que contêm linfócitos tais como amostras de sangue, baço ou de medula óssea de um animal não-humano imunizado/vacinado com um polipeptídeo ou um peptídeo de EGFR humano ou com proteínas de EGFR derivadas de uma célula que expressa

EGFR humano ou com células que expressam EGFR humano ou frações de tais células. Preferencialmente, as frações que contêm linfócitos são coletadas de mamíferos não-humanos ou de animais transgênicos com genes de imunoglobulinas humanas. A fração de células contendo linfócitos coletada pode ser adicionalmente enriquecida para a obtenção de uma população de linfócitos particular, por exemplo, células da linhagem de linfócitos B. Preferencialmente, o enriquecimento é realizado utilizando a separação de células com esferas magnéticas (MACS) e/ou a separação de células ativadas por fluorescência (FACS), tirando vantagem de proteínas marcadoras de superfície celular específicas à linhagem, por exemplo, para células B, blastos do plasma e/ou células plasmáticas. Preferencialmente, a fração de células que contém linfócitos é enriquecida ou separada em relação às células B, aos blatos do plasma e/ou às células plasmáticas. Ainda mais preferencialmente, as células com alta expressão de CD43 e CD138 são isoladas do baço ou do sangue. Estas células são algumas vezes denominadas de células plasmáticas circulantes, células plasmáticas precoces ou blastos do plasma. Para facilitar, são apenas denominadas células plasmáticas na presente invenção, embora os outros termos possam ser utilizados de forma intercambiável.

O isolamento de sequências codificadoras de V_H e V_L pode também ser realizado da maneira clássica em que as sequências codificadoras de V_H e V_L são combinadas aleatoriamente em um vetor para gerar uma biblioteca combinatória de pares de sequências codificadoras de V_H e V_L. Entretanto, na presente invenção é preferido refletir a diversidade, a afinidade e a especificidade dos anticorpos produzidos em uma resposta imunológica humoral após a imunização com EGFR. Isto envolve a manutenção do pareamento de V_H e V_L originalmente presente no doador, gerando assim um repertório de pares de sequências em que cada par codifica uma cadeia pesada variável (V_H) e uma cadeia leve variável (V_L) correspondendo a um par de V_H e V_L originalmente presente em um anticorpo produzido pelo doador do qual as sequências são isoladas. Este também é chamado de um par cognato de sequências codificadoras de V_H e V_L e o anticorpo é chamado de

um anticorpo cognato. Preferencialmente, os pares codificadores de V_H e V_L da presente invenção, combinatórios ou cognatos, são obtidos de camundongos doadores e, portanto, as sequências são murinas.

Há várias abordagens diferentes para a produção de pares cognatos de sequências codificadoras de V_H e V_L, uma abordagem envolve a amplificação e o isolamento de sequências codificadoras de V_H e V_L de células isoladas separadas de uma fração de células que contém linfócitos. Para a obtenção de um repertório de pares de sequências codificadoras de V_H e V_L que corresponde à diversidade de pares de sequências de V_H e V_L no doador, é preferido um método de alto rendimento com o mínimo de mistura (combinação aleatória) dos pares de V_H e V_L possível, por exemplo, como descrito na WO 2005/042774 (incorporada aqui como referência).

As sequências codificadoras de V_H e V_L podem ser amplificadas separadamente e pareadas em uma segunda etapa ou podem ser pareadas durante a amplificação (Coronella e outros 2000, Nucleic Acids Res. 28: E85; Babcook e outros 1996. PNAS 93: 7843-7848 e WO 2005/042774). Uma segunda abordagem envolve a amplificação em célula e o pareamento das sequências codificadoras de V_H e V_L (Embleton e outros 1992. Nucleic Acids Res. 20: 3831-3837; Chapal e outros 1997. BioTechniques 23: 518-524). Uma terceira abordagem é o método de anticorpo de linfócito selecionado (SLAM) que combina um ensaio de placa hemolítico com a clonagem do cDNA de V_H e V_L (Babcook e outros 1996. PNAS 93:7843-7848). Um outro método que pode ser utilizado com camundongos é a técnica de hibridoma padronizada, seguida pela verificação e a seleção de candidatos principais e pela clonagem subsequente dos anticorpos codificados.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, é gerado um repertório de pares que codificam V_H e V_L, em que os pares de membros espelham os pares de genes responsáveis pela resposta imunológica humoral resultante de uma imunização com EGFR de acordo com um método que compreende as etapas i) de fornecimento de uma fração de células que contém linfócitos de um doador animal imunizado com EGFR humano; ii) de enriquecimento opcional de células B ou de células plasmáticas da dita fração

de células; iii) de obtenção de uma população de células únicas isoladas, que compreende a distribuição de células da dita fração de células individualmente em um grande número de recipientes; iv) de amplificação e realização de ligação dos pares que codificam V_H e V_L, em um procedimento de RT-PCR com extensão sobreposta multiplex, utilizando um molde derivado das ditas células únicas isoladas e v) de realização opcional de uma PCR aninhada dos pares que codificam V_H e V_L ligados. Preferencialmente, os pares que codificam V_H e V_L cognatos isolados são submetidos a um procedimento de verificação como descrito a seguir.

Uma vez que os pares de sequências de V_H e V_L foram gerados, é realizado um procedimento de verificação para identificar as sequências que codificam os pares de V_H e V_L com reatividade de ligação em direção a um antígeno associado ao EGFR. Preferencialmente, o antígeno associado ao EGFR é compreendido de uma parte extracelular de EGFR tal como o domínio III, II, I e/ou IV, fragmentos dos domínios ou o domínio extracelular completo. Outros antígenos incluem mutantes tais como mutantes de deleção de EGFR ou SNPs ou fragmentos dos mesmos. Se os pares de sequências de V_H e V_L forem combinatórios, um procedimento de exibição em fagos pode ser aplicado para enriquecer os pares de V_H e V_L que codificam os fragmentos de anticorpos que se ligam ao EGFR antes da verificação.

Para espelhar a diversidade, a afinidade e a especificidade dos anticorpos produzidos em uma resposta imunológica humoral após a imunização com EGFR, a presente invenção desenvolveu um procedimento de verificação para os pares cognatos, com a finalidade de obtenção da diversidade mais ampla possível. Para as finalidades de verificação, o repertório de pares cognatos que codificam V_H e V_L é expresso individualmente na forma de fragmentos de anticorpos (por exemplo, scFv ou Fab) ou na forma de anticorpos de comprimento completo utilizando um vetor de verificação bacteriano ou de mamífero transfectado em uma célula hospedeira adequada. O repertório de Fabs/anticorpos pode ser verificado - sem limitação - em relação à reatividade ao EGFR, em relação à atividade antiproliferativa contra uma linhagem de células cancerosas que expressa EGFR e em relação à

capacidade de inibir a ligação do ligante (por exemplo, EGF) ao EGFR, em relação à inibição da fosforilação, à indução da apoptose, à internalização do EGFR.

Em paralelo, o repertório de Fabs/anticorpos é verificado contra antígenos selecionados tais como peptídeos de EGFR humanos e opcionalmente de cinomólgo ou de chimpanzé ou de macaco rhesus. Os peptídeos antigênicos podem, por exemplo, ser selecionados partindo do domínio extracelular do EGFR humano, do domínio extracelular do EGFR mutante humano e do domínio extracelular do EGFR de cinomólgo ou de fragmentos dos mesmos. Os peptídeos podem ser biotinilados para facilitar a imobilização sobre esferas ou placas durante a verificação. Meios de imobilização alternativos também podem ser utilizados. Os antígenos são selecionados com base no conhecimento da biologia do EGFR e no efeito de neutralização e/ou protetor esperado que os anticorpos capazes de se ligar a estes antígenos podem potencialmente fornecer. Este procedimento de verificação pode similarmente ser aplicado a uma biblioteca combinatória de exibição em fagos.

As proteínas EGFR recombinantes utilizadas para a verificação podem ser expressas em bactérias, células de insetos, células de mamíferos ou outro sistema de expressão adequado. Para o processamento correto (incluindo a glicosilação) as proteínas são expressas em células de mamíferos. A proteína EGFR-ECD pode ser expressa na forma de uma proteína solúvel (sem a região transmembrana e intracelular) ou pode ser fundida a uma terceira proteína, para aumentar a estabilidade. Se a proteína EGFR for expressa com uma marcação de fusão, o parceiro de fusão pode ser extraído por clivagem antes da verificação. Em adição à verificação primária descrita anteriormente, pode ser realizada uma verificação secundária, para garantir que nenhuma das sequências selecionadas codifique falsos positivos.

Geralmente, os ensaios imunológicos são adequados para a verificação realizada na presente invenção. Tais ensaios são bem-conhecidos na técnica e constituem, por exemplo, ELISPOT, ELISA, FLISA, ensaios em membrana (por exemplo, Western blots), arranjos sobre filtros e FACS. Os

ensaios podem ser realizados sem quaisquer etapas de enriquecimento prévias, utilizando polipeptídeos produzidos partindo das sequências que codificam os pares de V_H e V_L. No evento em que o repertório de pares que codificam V_H e V_L são pares cognatos, nenhum enriquecimento, por exemplo, através da exibição em fagos é necessário antes da verificação. Entretanto, na verificação de bibliotecas combinatórias, os ensaios imunológicos são preferencialmente realizados em combinação com ou após métodos de enriquecimento tal como exibição em fagos, exibição em ribossomos, exibição na superfície de bactérias, exibição em leveduras, exibição em vírus eucarióticos, exibição em RNA ou exibição covalente (revisado em FitzGerald, K., 2000, Drug Discov. Today 5, 253-258).

As sequências codificadoras do par V_H e V_L selecionadas na verificação são geralmente submetidas ao sequenciamento e analisadas em relação à diversidade das regiões variáveis. Em particular, a diversidade nas regiões CDR é interessante, mas também a representação da família de V_H e V_L é interessante. Com base nestas análises, são selecionadas as sequências que codificam os pares de V_H e V_L que representam a diversidade total dos anticorpos que se ligam ao EGFR isolados de um ou mais doadores animais. Preferencialmente, são selecionadas as sequências com diferenças em todas as regiões CDR (CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL1, CDRL2 e CDRL3). Se houver sequências com uma ou mais regiões CDR idênticas ou muito similares que pertencem a famílias de V_H ou V_L diferentes, estas também são selecionadas. Preferencialmente, pelo menos a região CDR3 da cadeia pesada variável (CDRH3) difere entre os pares de sequências selecionados. Potencialmente, a seleção de pares de sequências de V_H e V_L pode ser baseada fortemente na variabilidade da região CDRH3. Durante a iniciação e a amplificação das sequências, podem ocorrer mutações nas regiões estruturais da região variável, em particular, na primeira região estrutural. Preferencialmente, os erros que ocorrem na primeira região estrutural são corrigidos com a finalidade de garantir que as sequências correspondam completamente ou pelo menos a 98% daquelas de origem na linhagem germinativa, por exemplo, de forma que as sequências de V_H e V_L se-

jam completamente murinas.

Quando é garantido que a diversidade total da coleção de sequências selecionadas que codificam os pares de V_H e V_L é altamente representativa da diversidade observada no nível genético em uma resposta humoral a uma imunização com EGFR, é esperado que a especificidade total dos anticorpos expressos partindo de uma coleção de pares selecionados que codificam V_H e V_L também seja representativa em relação à especificidade dos anticorpos produzidos nos animais imunizados com EGFR. Uma indicação do fato da especificidade dos anticorpos expressos partindo de uma coleção de pares selecionados que codificam V_H e V_L ser representativa da especificidade dos anticorpos produzidos pelos doadores pode ser obtida através da comparação dos títulos dos anticorpos para os antígenos selecionados do sangue do doador com a especificidade dos anticorpos expressa partindo de uma coleção de pares selecionados que codificam V_H e V_L. Adicionalmente, a especificidade dos anticorpos expressos partindo de uma coleção de pares selecionados que codificam V_H e V_L pode ser adicionalmente analisada. O grau de especificidade se correlaciona com o número de antígenos diferentes para os quais a reatividade de ligação pode ser detectada. Em uma modalidade adicional da presente invenção, a especificidade dos anticorpos individuais expressos partindo de uma coleção de pares selecionados que codificam V_H e V_L é analisada através do mapeamento dos epitopos.

O mapeamento dos epitopos pode ser realizado através de um número de metodologias, que não necessariamente excluem cada outra. Uma maneira de mapear a especificidade ao epitopo de uma molécula de anticorpo é avaliar a ligação aos peptídeos de comprimentos variáveis derivados da estrutura primária do antígeno-alvo. Tais peptídeos podem ser tanto lineares quanto conformacionais e podem ser utilizados em um número de formatos de ensaios, incluindo ELISA, FLISA e Ressonância de Plasmônio de Superfície (SPR, Biacore, FACS). Além disso, os peptídeos podem ser selecionados de forma racional utilizando dados de sequências e estruturais disponíveis para representar, por exemplo, regiões extracelulares ou regiões

conservadas do antígeno-alvo ou podem ser planejados como um conjunto de peptídeos sobrepostos que representa uma parte selecionada ou todo o antígeno (Meloen RH, Puijk WC, Schaaper WMM. Epitope mapping by PEP-SCAN. Em: Immunology Methods Manual. Ed Iwan Lefkovits 1997, Academic Press, pp 982-988). A reatividade específica de um clone de anticorpo com um ou mais tais peptídeos será geralmente uma indicação da especificidade do epitopo. Entretanto, os peptídeos são em muitos casos fracos imitadores dos epitopos reconhecidos pelos anticorpos produzidos contra antígenos proteicos, tanto por causa de uma ausência de conformação natural ou específica quanto devido à área de superfície inserida de interação geralmente maior entre um anticorpo e um antígeno proteico quando comparada à de um anticorpo e um peptídeo. Um segundo método para o mapeamento de epitopos, que permite a definição das especificidades diretamente no antígeno proteico, é através do mascaramento seletivo do epitopo utilizando anticorpos bem definidos existentes. A ligação reduzida de uma segundo anticorpo de sondagem ao antígeno após o bloqueio é geralmente indicativa de epitopos compartilhados ou sobrepostos. O mapeamento de epitopos através do mascaramento seletivo pode ser realizado através de um número de ensaios imunológicos, incluindo, mas não restritos a ELISA e Biacore, que são bem-conhecidos na técnica (por exemplo, Ditzel e outros 1997. J. Mol. Biol. 267:684-695; Aldaz-Carroll e outros 2005. J. Virol. 79: 6260-6271). Ainda um outro método potencial para a determinação da especificidade ao epitopo de anticorpos anti-EGFR é a seleção de mutantes de escape na presença de anticorpo. Esta pode, por exemplo, ser realizada utilizando uma varredura de alanina. O sequenciamento do(s) gene(s) de interesse de tais mutantes de escape geralmente revelará quais aminoácidos no(s) antígeno(s) que são importantes para o reconhecimento pelo anticorpo e assim constituem (parte de) o epitopo.

Produção de uma composição de anticorpo anti-EGFR de pares selecionados que codificam V_H e V_L

Uma composição de anticorpos da presente invenção pode ser produzida partindo de uma linhagem de células de expressão policlonal em

um ou alguns biorreatores ou equivalentes dos mesmos. Após esta abordagem os anticorpos anti-EGFR podem ser purificados do reator na forma de uma preparação única sem ter que separar os membros individuais que constituem a composição de anticorpo anti-EGFR durante o processo. Se a composição de anticorpos for produzida em mais de um biorreator, a composição de anticorpo anti-EGFR purificada pode ser obtida através do agrupamento dos anticorpos obtidos partindo de sobrenadantes individualmente purificados de cada biorreator.

Uma maneira de produzir uma composição de anticorpos recombinantes é descrita na WO 2004/061104 e na WO 2006/007850 (estas referências são incorporadas aqui como referência). O método descrito nas mesmas baseia-se na integração específica ao sítio da sequência codificadora do anticorpo dentro do genoma das células hospedeiras individuais, garantindo que as cadeias de proteínas de V_H e V_L sejam mantidas em seu pareamento original durante a produção. Além disso, a integração específica ao sítio minimiza os efeitos de posição e, portanto, é esperado que as propriedades de crescimento e de expressão das células individuais na linhagem de células policlonais sejam muito similares. Geralmente, o método envolve o seguinte: i) uma célula hospedeira com um ou mais sítios de reconhecimento da recombinase; ii) um vetor de expressão com pelo menos um sítio de reconhecimento da recombinase compatível com o da célula hospedeira; iii) produção de uma coleção de vetores de expressão através da transferência dos pares selecionados que codificam V_H e V_L do vetor de verificação para um vetor de expressão de forma que um anticorpo de comprimento completo ou um fragmento de anticorpo possa ser expresso partindo do vetor (tal transferência pode não ser necessária se o vetor de verificação for idêntico ao vetor de expressão); iv) transfecção da célula hospedeira com a coleção de vetores de expressão e um vetor que codifica uma recombinase capaz de combinar os sítios de reconhecimento da recombinase no genoma da célula hospedeira com aquele no vetor; v) obtenção/produção de uma linhagem de células policlonais partindo da célula hospedeira transfectada e vi) expressão e coleta da composição de anticorpos da linhagem de

células policlonais.

Quando um número pequeno (2-3 ou mais) de anticorpos é utilizado para uma composição, estes podem ser expressos e purificados individualmente de uma maneira similar à produção de anticorpos monoclonais, por exemplo, como descrito na WO 2004/085474. Os anticorpos purificados podem ser misturados após a purificação ou podem ser embalados em frascos separados para mistura antes da administração ou para administração separada.

Preferencialmente células de mamífero tais como células CHO, células COS, células BHK, células de mieloma (por exemplo, células Sp2/0 ou NS0), fibroblastos tal como NIH 3T3 e células humanas imortalizadas, tais como células HeLa, células HEK 293 ou PER.C6, são utilizadas. Entretanto, células eucarióticas sem ser de mamífero ou procarióticas, tais como células vegetais, células de insetos, células de levedura, fungo, *E. coli* etc., também podem ser empregadas. Uma célula hospedeira adequada compreende um ou mais sítios de reconhecimento da recombinase adequados em seu genoma. A célula hospedeira deve também conter um modo de seleção que está ligado de forma operacional ao sítio de integração, para possibilitar a seleção dos integrantes, (isto é, células que possuem uma cópia integrada de um vetor de expressão de Ab anti-EGFR ou um fragmento de vetor de expressão no sítio de integração). A preparação de células que possuem um sítio FRT em uma localização predeterminada no genoma foi descrita, por exemplo, na US 5.677.177. Preferencialmente, uma célula hospedeira possui apenas um único sítio de integração, que fica localizado em um sítio que permite a alta expressão do integrante (um assim chamado "hot-spot").

Um vetor de expressão adequado compreende um sítio de reconhecimento de recombinação que é compatível com o(s) sítio(s) de reconhecimento da recombinase da célula hospedeira. Preferencialmente o sítio de reconhecimento da recombinase está ligado a um gene de seleção adequado diferente do gene de seleção utilizado para a construção da célula hospedeira. Os genes de seleção são bem-conhecidos na técnica e incluem o gene da glutamina sintetase (GS), o gene da di-hidrofolato redutase (DH-

FR) e a neomicina, em que o GS ou o DHFR pode ser utilizado para a amplificação gênica da sequência V_H e V_L inserida. O vetor também pode conter dois sítios de reconhecimento da recombinase diferentes para permitir a troca de cassetes mediada pela recombinase (RMCE) da sequência codificadora do anticorpo ao invés da integração completa do vetor. A RMCE é descrita em (Langer e outros 2002; Schlake e Bode 1994). Os sítios de reconhecimento da recombinase adequados são bem-conhecidos na técnica e incluem os sítios FRT, lox e attP/attB. Preferencialmente o vetor de integração é um vetor que codifica isotipo, em que as regiões constantes (preferencialmente incluindo íntrons) estão presentes no vetor antes da transferência do par codificador de V_H e V_L do vetor de verificação (ou as regiões constantes já estão presentes no vetor de verificação se a verificação for realizada em anticorpos de comprimento completo. As regiões constantes presentes no vetor podem ser a região constante de cadeia pesada inteira (CH_1 até CH_3 ou até CH_4) ou a região constante que codifica a parte Fc do anticorpo (CH_2 até CH_3 ou até CH_4). A região constante Kappa ou Lambda de cadeia leve também pode estar presente antes da transferência. A escolha do número de regiões constantes presentes, se alguma, depende do sistema de verificação e de transferência utilizado. As regiões constantes de cadeia pesada podem ser selecionadas dos isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD e IgE. Os isotipos preferidos são IgG1, IgG2 e/ou IgG3. Ainda, o vetor de expressão para a integração específica ao sítio do ácido nucleico que codifica o anticorpo anti-EGFR contém promotores adequados ou sequências equivalentes que direcionam altos níveis de expressão de cada uma das cadeias V_H e V_L. A Figura 4 ilustra uma maneira possível de planejar o vetor de expressão, embora vários outros planejamentos sejam possíveis.

A transferência dos pares selecionados que codificam V_H e V_L partindo do vetor de verificação pode ser realizada através da clivagem com enzimas de restrição convencionais e ligação, de forma que cada molécula de vetor de expressão contenha um par que codifica V_H e V_L. Preferencialmente, os pares que codificam V_H e V_L são transferidos individualmente, es-

tes podem, entretanto, também ser transferidos em massa se desejado. Quando todos os pares selecionados que codificam V_H e V_L são transferidos para o vetor de expressão uma coleção ou uma biblioteca de vetores de expressão é obtida. Meios alternativos de transferência também podem ser utilizados se desejado. Se o vetor de verificação for idêntico ao vetor de expressão, a biblioteca de vetores de expressão é constituída dos pares de sequências de V_H e V_L durante a verificação, que ficam situados no vetor de verificação/de expressão.

Os métodos para a transfecção de uma sequência de ácido nucleico para dentro de uma célula hospedeira são conhecidos na técnica. Para garantir a integração específica ao sítio, uma recombinase adequada também tem que ser fornecida à célula hospedeira. Isto é preferencialmente realizado através da cotransfecção de um plasmídeo que codifica a recombinase. As recombinases adequadas são, por exemplo, Flp, Cre ou integrase do fago ΦC31, utilizada junto com um sistema de célula hospedeira/vetor com os sítios de reconhecimento da recombinase correspondentes. A célula hospedeira pode também ser transfectada em massa, significando que a biblioteca de vetores de expressão é transfectada na linhagem de células em uma única reação sendo obtida assim uma linhagem de células policlonais. Alternativamente, a coleção de vetores de expressão pode ser transfectada individualmente na célula hospedeira, gerando assim uma coleção de linhagens de células individuais (cada linhagem de células produz um anticorpo com uma especificidade particular). As linhagens de células geradas após a transfecção (individuais ou policlonais) são então selecionadas em relação aos integrantes específicos ao sítio e adaptadas para crescerem em suspensão e meios isentos de soro, se já não possuírem estas propriedades antes da transfecção. Se a transfecção tiver sido realizada individualmente, as linhagens de células individuais são analizadas adicionalmente em relação às suas propriedades de crescimento e à produção de anticorpo. Preferencialmente, as linhagens de células com taxas de proliferação e níveis de expressão de anticorpo similares são selecionadas para a produção da linhagem de células policlonais. A linhagem de células policlonais é então

gerada através da mistura das linhagens de células individuais em uma proporção predefinida. Geralmente, um banco de células principais policlonais (pMCB), um banco de células de pesquisa policlonais (pRCB) e/ou um banco de células de trabalho policlonais (pWCB) é estabelecido partindo da linhagem de células policlonais. A linhagem de células policlonais é gerada através da mistura das linhagens de células individuais em uma proporção predefinida. A linhagem de células policlonais é distribuída em ampolas gerando assim um banco de células de pesquisa policlonais (pRCB) ou um banco de células principais (pMCB) partindo do qual um banco de células de trabalho policlonais (pWCB) pode ser gerado através da expansão das células partindo do banco de células de pesquisa ou principais. O banco de células de pesquisa é primariamente para provar os estudos de conceito, nos quais a linhagem de células policlonais pode não compreender tantos anticorpos individuais quanto a linhagem de células policlonais no banco de células principais. Normalmente, o pMCB é adicionalmente expandido para estabelecer um pWCB com finalidades de produção. Uma vez que o pWCB está exaurido, uma nova ampola do pMCB pode ser expandida para estabelecer um novo pWCB.

Uma modalidade da presente invenção é uma linhagem de células policlonais capaz de expressar uma composição de anticorpo anti-EGFR recombinante da presente invenção.

Uma modalidade adicional da presente invenção é uma linhagem de células policlonais em que cada célula individual é capaz de expressar um único par que codifica V_H e V_L e a linhagem de células policlonais como um todo é capaz de expressar uma coleção de pares que codificam V_H e V_L, em que cada par de V_H e V_L codifica um anticorpo anti-EGFR. Preferencialmente a coleção de pares que codificam V_H e V_L são pares cognatos gerados de acordo com os métodos da presente invenção.

Uma composição de anticorpos recombinantes da presente invenção pode ser produzida através da cultura de uma ampola de um pWCB em um meio apropriado durante um período de tempo que permita a expressão suficiente de anticorpo e em que a linhagem de células policlonais per-

maneça estável (A janela é de aproximadamente entre 15 dias e 50 dias). Podem ser utilizados métodos de cultura tal como batelada alimentada ou perfusão. A composição de anticorpos recombinantes é obtida do meio de cultura e purificada através de técnicas de purificação convencionais. A cromatografia por afinidade combinada com etapas de purificação subsequentes tais como cromatografia por troca iônica, interações hidrofóbicas e filtração em gel tem sido frequentemente utilizada para a purificação de IgG. Após a purificação, a presença de todos os membros individuais na composição de anticorpos policlonais é avaliada, por exemplo, através de cromatografia por troca iônica. A caracterização de tal composição de anticorpos é descrita em detalhes na WO 2006/007853 (incorporada aqui como referência).

Um método alternativo de expressão de uma mistura de anticorpos em um hospedeiro recombinante é descrito na WO 2004/009618. Este método produz anticorpos com cadeias pesadas diferentes associadas com a mesma cadeia leve proveniente de uma única linhagem de células. Esta abordagem pode ser aplicável se a composição de anticorpo anti-EGFR for produzida partindo de uma biblioteca combinatória.

Composições terapêuticas

Um outro aspecto da invenção é uma composição farmacêutica que compreende como um ingrediente ativo uma composição de anticorpos anti-EGFR ou de Fab recombinante anti-EGFR ou uma outra composição de fragmentos de anticorpos recombinantes anti-EGFR ou uma molécula de ligação biespecífica da invenção. Preferencialmente, o ingrediente ativo de tal composição é uma composição de anticorpos recombinantes anti-EGFR como descrito na presente invenção. É pretendido que tais composições sejam para a melhora e/ou para a prevenção e/ou para o tratamento de câncer. Preferencialmente, a composição farmacêutica é administrada a um ser humano, um animal doméstico ou um animal de companhia.

A composição farmacêutica compreende ainda um excipiente farmaceuticamente aceitável.

A composição de anticorpos anti-EGFR ou os fragmentos dos

anticorpos da mesma podem ser administrados dentro de um diluente, um carreador ou um excipiente farmaceuticamente aceitável, em uma forma de dosagem unitária. A prática farmacêutica convencional pode ser empregada para fornecer formulações ou composições adequadas para a administração a pacientes com câncer. Em uma modalidade preferida, a administração é terapêutica, significando que é realizada após uma condição de câncer ter sido diagnosticada. Qualquer via apropriada de administração pode ser empregada, por exemplo, a administração pode ser administração parenteral, intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, por aerossol, por supositório ou oral. Por exemplo, as formulações farmacêuticas podem estar na forma de soluções ou de suspensões líquidas. Para a administração oral, é necessário que estas estejam protegidas contra a degradação no estômago. Para as formulações intranasais, os anticorpos podem ser administrados na forma de pós, gotas nasais ou aerossóis.

As composições farmacêuticas da presente invenção são preparadas de uma maneira conhecida *per se*, por exemplo, através de processos convencionais de dissolução, liofilização, mistura, granulação ou preparação. As composições farmacêuticas podem ser formuladas de acordo com a prática farmacêutica convencional (vide, por exemplo, em Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed.), ed. A.R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, PA e Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick e J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nova York, NY).

Preferencialmente as soluções ou as suspensões do ingrediente ativo e especialmente soluções ou suspensões aquosas isotônicas, são utilizadas para preparar as composições farmacêuticas da presente invenção. No caso de composições liofilizadas que compreendem o ingrediente ativo isoladamente ou junto com um carreador, por exemplo, manitol, tais soluções ou suspensões podem, se possível, ser produzidas antes do uso. As composições farmacêuticas podem ser esterilizadas e/ou podem compreender excipientes, por exemplo, conservantes, estabilizantes, agentes umec-

tantes e/ou emulsificantes, solubilizantes, sais para a regulação da pressão osmótica e/ou tampões e são preparadas de uma maneira conhecida *per se*, por exemplo, através de processos convencionais de dissolução ou de liofilização. As ditas soluções ou suspensões podem compreender substâncias que aumentam a viscosidade, tal como carboximetilcelulose de sódio, carboximetilcelulose, dextrano, polivinilpirrolidona ou gelatina.

As composições para injeção são preparadas de maneira costumeira sob condições estéreis; o mesmo também se aplica à introdução das composições em ampolas ou frascos e à vedação dos recipientes.

As composições farmacêuticas compreendem de aproximadamente 1% até aproximadamente 95%, preferencialmente de aproximadamente 20% até aproximadamente 90% de ingrediente ativo. As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem, por exemplo, estar na forma de dose unitária, tal como na forma de ampolas, frascos, supositórios, comprimidos, pílulas ou cápsulas. As formulações podem ser administradas a indivíduos humanos em quantidades terapeuticamente ou profilaticamente eficientes (por exemplo, quantidades que previnem, eliminam ou reduzem um estado de saúde patológico) para fornecer terapia para uma doença ou um estado de saúde. É provável que a dosagem preferida de agente terapêutico que será administrada dependa de variáveis tais como a gravidade do câncer, da condição geral de saúde do paciente particular, da formulação dos excipientes do composto e de sua via de administração.

Usos terapêuticos das composições de acordo com a invenção

As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas para o tratamento ou para a melhora de uma doença em um mamífero. Os estados de saúde que podem ser tratados ou prevenidos com as presentes composições farmacêuticas incluem a prevenção e o tratamento de pacientes com câncer pode ser preferencialmente submetido ao tratamento terapêutico com uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção.

Uma modalidade da presente invenção é um método de prevenção, tratamento ou melhora de um ou mais sintomas associados com

câncer em um mamífero, que compreende a administração de uma quantidade eficiente de uma composição de anticorpos recombinantes anti-EGFR da presente invenção ao dito mamífero.

Uma modalidade adicional da presente invenção é o uso de uma composição de anticorpos recombinantes anti-EGFR da presente invenção para a preparação de uma composição para o tratamento, a melhora ou a prevenção de um ou mais sintomas associados com câncer em um mamífero.

Preferencialmente, o mamífero nas modalidades anteriores é um ser humano, um animal doméstico ou um animal de companhia.

Os anticorpos de acordo com a presente invenção são indicados no tratamento de certos tumores sólidos. Com base em um número de fatores, incluindo os níveis de expressão de EGFR, entre outros, os tipos de tumores a seguir parecem apresentar indicações preferidas: câncer de mama, de ovário, de cólon, retal, de próstata, de bexiga, pancreático, de cabeça e pescoço e pulmonar de células não-pequenas. Em associação com cada uma destas indicações, três vias clínicas parecem oferecer potenciais distintos para sucesso clínico:

Terapia adjunta: Na terapia adjunta, os pacientes seriam tratados com os anticorpos de acordo com a presente invenção em combinação com um agente quimioterapêutico ou antineoplásico e/ou uma terapia de radiação. Os alvos primários listados anteriormente serão tratados sob protocolo através da adição dos anticorpos da invenção à terapia padronizada de primeira e de segunda linhas. Os planejamentos do protocolo se dirigirão à eficiência que é avaliada pela redução na massa tumoral assim à capacidade de reduzir doses usuais de quimioterapia padronizada. Estas reduções na dosagem permitirão uma terapia adicional e/ou prolongada através da redução da toxicidade relacionada à dose do agente quimioterapêutico. Os anticorpos anti-EGFR da técnica anterior foram ou estão sendo utilizados em vários testes clínicos adjuntos em combinação com os agentes quimioterapêuticos ou antineoplásicos adriamicina (Erbitux: carcinoma avançado de próstata), cisplatina (Exbitux: carcinomas avançados de cabeça e pescoço e

pulmonar), taxol (Erbitux: câncer de mama) e doxorrubicina (Erbitux).

A invenção fornece artigos farmacêuticos que compreendem uma composição de anticorpos da invenção e pelo menos um composto capaz de induzir a diferenciação de células cancerosas na forma de uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia de câncer. Através da combinação das composições de anticorpos da invenção com agentes conhecidos por induzirem a diferenciação terminal de células cancerosas, o efeito pode ser adicionalmente aumentado.

O pelo menos um composto pode ser selecionado do grupo que consiste em ácido retinóico, ácidos trans-retinóicos, ácidos cis-retinóicos, fenilbutirato, fator de crescimento de nervos, sulfóxido de dimetila, vitamina D(3) forma ativa, receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomos, 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol, hexametileno-bis-acetamida, fator-beta de crescimento de transformação, ácido butírico, AMP cíclico e vesnarinona. Preferencialmente o composto é selecionado do grupo que consiste em ácido retinóico, fenilbutirato, ácido todo-trans-retinóico, vitamina D forma ativa.

Os artigos farmacêuticos que compreendem uma composição de anticorpos da invenção e pelo menos um composto quimioterapêutico ou antineoplásico podem ser utilizados como uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia de câncer. O composto quimioterapêutico pode ser selecionado do grupo que consiste em adriamicina, cisplatina, taxol, doxorrubicina, topotecano, fluoropirimidina, oxaliplatina e irinotecano.

Monoterapia: Em associação com o uso dos anticorpos de acordo com a presente invenção na monoterapia de tumores, os anticorpos podem ser administrados a pacientes sem um agente quimioterapêutico ou antineoplásico. Os resultados pré-clínicos gerados através do uso de anticorpos de acordo com a presente invenção e discutidos aqui demonstraram resultados positivos como uma terapia independente.

Agente de Formação de Imagem: Através da ligação de um radionuclídeo (por exemplo, ítrio (^{90}Y) aos anticorpos de acordo com a presen-

te invenção, é esperado que os anticorpos marcados radioativamente de acordo com a presente invenção possam ser utilizados como um agente de formação de imagem para diagnóstico. Em tal função, os anticorpos da invenção serão localizados tanto em tumores sólidos quanto em lesões metastásicas de células que expressam EGFR. Em associação ao uso dos anticorpos da invenção como agentes de formação de imagem, os anticorpos podem ser utilizados no auxílio do tratamento cirúrgico de tumores sólidos, tanto como uma verificação pré-cirúrgica quanto um acompanhamento pós-operatório para determinar qual tumor permanece e/ou retorna. Um anticorpo (^{111}In)-Erbitux foi utilizado como um agente de formação de imagem em um teste clínico humano de Fase I em pacientes que possuíam carcinomas pulmonares de células escamosas que não podiam ser removidos por cirurgia. (Divgi e outros J. Natl. Cancer Inst. 83:97-104 (1991)). Os pacientes foram acompanhados com câmera gama padronizada anterior e posterior. Os dados preliminares indicaram que todas as lesões primárias e as lesões metastásicas grandes foram identificadas, enquanto que somente a metade das lesões metastásicas pequenas (menores que 1 cm) não foram detectadas.

Os inibidores da tirosina quinase (TKIs) são moléculas sintéticas de baixo peso molecular principalmente derivadas de quinazolina que interagem com o domínio da tirosina quinase intracelular dos receptores e inibindo a fosforilação do receptor induzida pelo ligante através da competição pelo sítio de ligação ao Mg-ATP intracelular. Vários TKIs no desenvolvimento clínico incluindo Gefitinib (Iressa, ZD1839), Erlobtinib (Tarceva, OSI-774), Lapatinib, (Tykerb, GW572016), Canertinib (CI-1033), EKB-569 e PKI-166 estão direcionados ao EGFR. O tratamento de combinação de TKIs e anti-EGFR mostrou ser benéfico tanto *in vivo* quanto *in vitro* contra células cancerosas dependentes de EGFR. Os artigos farmacêuticos que compreendem uma composição de anticorpos da invenção e pelo menos um TKI que se direciona ao EGFR podem ser utilizados como uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia de câncer. Os inibidores adicionais de moléculas pequenas incluem: Sorafinib (raf e múltiplos RTKs), Sunitinib (Múltiplos RTKs), Temsirolimus (mTOR), RAD001

(mTOR) e AZD217 (VEGFR2).

Em outras modalidades, as composições de anticorpos da presente invenção são utilizadas em combinação com outros produtos terapêuticos de anticorpo. Os exemplos destes incluem, por exemplo, anticorpos contra HER2 (Herceptina) e VEGF (avastina). Ainda em outras modalidades, as composições de anticorpos da presente invenção são utilizadas em combinação com um agente conhecido por estimular as células do sistema imunológico, tal tratamento de combinação levando a um maior aumento mediado pelo sistema imunológico da eficácia das composições de anticorpos da invenção. Os exemplos de tais agentes de estímulo imunológico incluem, mas não estão limitados às interleucinas recombinantes (por exemplo, IL-21 e IL-2).

Dose e Via de Administração

Embora a dosagem específica para os anticorpos de acordo com a invenção não tenha sido ainda determinada, certas considerações de dosagem podem ser determinadas através da comparação com o produto similar (ImClone C225 (Erbitux)) que foi aprovado. O anticorpo C225 está sendo tipicamente administrado com doses na faixa de 5 até 400 mg/m^2, com as doses mais baixes sendo utilizadas apenas em associação aos estudos de segurança. Consequentemente, seria esperado que a dosagem em pacientes com os anticorpos de acordo com a invenção pudesse estar nesta faixa ou inferior, talvez na faixa de 50 até 300 mg/m^2 e ainda permanecer eficiente. A dosagem em mg/m^2, ao contrário da medida convencional de dose em mg/kg, é uma medida baseada na área de superfície e é uma medida de dosagem conveniente que é planejada para incluir pacientes de todos os tamanhos de crianças até adultos.

A informação prescritiva disponível para o Erbitux (Cetuximab) inclui uma infusão IV inicial de 120 minutos de 400 mg/m^2, seguida por infusões semanais de 60 min de 250 mg/m^2. Estas dosagens são recomendadas para o tratamento independente assim como para combinação com a terapia de radiação. Para o Vectibix (panitumumab) a dose recomendada é de 6 mg/kg administrada ao longo de 60 minutos a cada 14 dias.

A dosagem clínica esperada do anticorpo HuMaxEGFr (zumutumumab) da Genmab é uma dose inicial de 8 mg/kg de HuMax-EGFr, seguida por infusões semanais de uma dose de manutenção até a progressão da doença. A dose de manutenção será ajustada quando necessário até que o paciente desenvolva uma erupção na pele limitante da dose, até uma dose máxima de 16 mg/kg de HuMax-EGFr (Dosagens para o estudo de Fase III principal, disponíveis na descrição do produto da Genmab).

É provável que a dosagem clínica das composições de anticorpos da presente invenção seja limitada pela extensão da erupção na pele que é observada com anticorpos monoclonais anti-EGFR (Erbitux e Vectibix) utilizados na clínica atualmente. Os dados provenientes de um estudo toxicológico de seis semanas em macacos cinomólogos não mostraram sinais de erupção na pele quando uma composição de anticorpos da invenção foi administrada em uma dose equivalente àquela que é utilizada para o tratamento com um dos anticorpos monoclonais utilizados na clínica (exemplo 20). Assim, as composições de anticorpos da invenção podem ser administradas de forma intravenosa e com uma dosagem semanal de 250 mg/m^2 que é traduzida em 7,5 mg/kg para um ser humano com uma superfície corporal de 1,8 m^2 e 60 kg de peso corporal. Além disso, uma dose de carga inicial de 400 mg/m^2 (que é traduzida em 12 mg/kg para um ser humano com uma superfície corporal de 1,8 m^2 e 60 kg de peso corporal) pode ser fornecida antes da dosagem semanal subsequente.

É esperado que três abordagens de fornecimento distintas sejam úteis para o fornecimento dos anticorpos de acordo com a invenção. O fornecimento intravenoso convencional será presumidamente a técnica de fornecimento padronizada para a maioria dos tumores. Entretanto, em associação com os tumores na cavidade peritoneal, tais como tumores dos ovários, do duto biliar, de outros dutos e similares, pode ser provado que a administração intraperitoneal é favorável para a obtenção de uma dose alta de anticorpo no tumor e para minimizar a eliminação do anticorpo. De uma maneira similar, certos tumores sólidos possuem sistema de vasos sanguíneos que é apropriado para a perfusão regional. A perfusão regional permitirá a

obtenção de uma dose alta do anticorpo no local de um tumor e minimizará a eliminação em curto prazo do anticorpo.

Como com qualquer produto terapêutico baseado na infusão de proteínas ou anticorpos, as preocupações com a segurança estão relacionadas primariamente com (i) a síndrome de libreação de citocinas, isto é, hipotensão, febre, tremores, calafrios, (ii) o desenvolvimento de uma resposta imunogênica ao material (isto é, desenvolvimento de anticorpos humanos pelo paciente para o anticorpo terapêutico ou resposta HAHA ou HACA) e (iii) a toxicidade para as células normais que expressam o receptor do EGF, por exemplo, hepatócitos que expressam EGFR. Os testes padronizados e o acompanhamento serão utilizados para monitorar cada uma destas preocupações com a segurança. Em particular, a função hepática será monitorada frequentemente durante os testes clínicos para avaliar danos no fígado, se algum.

Uso para diagnóstico

Uma outra modalidade da invenção está direcionada a kits para diagnóstico. Os kits de acordo com a presente invenção compreendem uma composição de anticorpos anti-EGFR preparada de acordo com a invenção cuja proteína pode ser marcada com uma marcação detectável ou não-marcada para detecção sem marcação. O kit pode ser utilizado para identificar indivíduos sofrendo de câncer associado com a superexpressão de EGFR.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 Clonagem de anticorpos anti-EGFR

Imunizações

Fêmeas de camundongos BALB/c, da cepa A ou C57B16 (8-10 semanas de idade) foram utilizadas para imunizações através de injeções com proteínas purificadas diferentes em adição às células que superexpressam EGFR.

Proteínas EGFR disponíveis comercialmente (R&D systems cat#1095-ER ou Sigma # E3641) foram utilizadas para algumas das imunizações. Para as outras imunizações o EGFR humano recombinante e o EG-

FRvIII produzidos na forma de proteínas de fusão foram utilizados consistindo no ECD do EGFR ou no EGFRvIII e o hormônio de crescimento humano (hGH), também incluindo um sítio de clivagem do Vírus Etch do Tabaco (TEV) em adição a um His-tag descrito no Exemplo 10b. Em alguns casos, o ECD do EGFR foi isolado através da clivagem com a protease do TEV e da purificação subsequente em uma coluna de Níquel.

A linhagem de células cancerosas de cabeça e pescoço humana, HN5 (Easty DM, Easty GC, Carter RL, Monaghan P, Butler LJ. Br J Cancer. 1981 Jun;43(6):772-85. Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck.) expressando aproximadamente 10^7 receptores/célula foi utilizada para imunizações baseadas em células. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS (Soro Fetal Bovino), 3 mM de Glicerol, 5 mM de Piruvato de Sódio e 1% de Penicilina Estreptomicina. Antes de cada imunização as células foram lavadas em PBS, tratadas com tripsina com TrypLE e ressuspensas em meio de cultura. Subsequentemente as suspensões de células foram lavadas duas vezes em PBS por centrifugação a 250Xg durante 5 min, desalojando e ressuspendendo em 15 mL de PBS esterilizado.

As células ou o antígeno foi diluído em PBS e então misturado 1:1 com Adjuvante de Freund. O adjuvante é utilizado para aumentar e para modular a resposta imunológica. Para as primeiras imunizações o Adjuvante Completo de Freund (CFA) foi utilizado enquanto o Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) foi utilizado para as imunizações subsequentes. O IFA é uma emulsão de óleo-em-água composta de óleos minerais e o CFA é o IFA ao qual são adicionadas espécies de Micobactérias secas mortas por tratamento térmico. Ambos os adjuvantes possuem um efeito de depósito. O CFA dá origem à persistência em longo prazo da resposta imunológica e é utilizado para as primeiras imunizações para estimular a resposta imunológica e o IFA é utilizado para imunizações subsequentes. As emulsões foram testadas através da adição de uma gota sobre a superfície de um vidro com água. Se a gota permanecer na forma de uma gota, a emulsão é estável e as injeções podem ser realizadas. Somente as emulsões estáveis foram administradas

aos camundongos.

Dependendo do planejamento (vide a *Tabela 2*), 25-100 µg de antígeno ou 10^7 células foram utilizadas para cada injeção. No total, os camundongos receberam 4 injeções. Todos os camundongos receberam injeções de 300 µL ou de 200 µL de emulsão. Dependendo do planejamento, as injeções foram realizadas de forma subcutânea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) ou intravenosa (i.v.).

No término, os camundongos foram sacrificados através do deslocamento cervical e os baços foram removidos e transferidos para um filtro de células de 74 µm (Corning#136350-3479). As células foram maceradas através do filtro, ressuspensas em RPMI 1640 gelado com 10% de FBS e centrifugadas a 300Xg durante 5 minutos. O pélete de células foi ressuspenso em RPMI 1640 com 1% de FBS, filtrado através de um filtro em seringa de 50 µm (BD# 340603) e coletado por centrifugação. O pélete de células foi criopreservado após a ressuspensão em FCS com 10% de DMSO e as células congeladas foram armazenadas a -80°C até a separação por FACS.

Separação por FACS de células plasmáticas murinas

Os frascos com esplenócitos congelados foram descongelados a 37°C e transferidos para um tubo de 15 mL com gelo ainda presente. 10 mL de RPMI resfriado em gelo, 10% de FBS (soro fetal bovino) foram adicionados em gotas no tubo durante agitação. Após uma lavagem em 10 mL de PBS para FACS, 5 mL de PBS para FCS são adicionados antes da filtração das células através de Filcon de 50 µm. As células foram então peletizadas e ressuspensas em 1 mL de PBS com 2% de FBS (volume final) e coradas com anti-CD43-FITC e anti-CD138-PE de acordo com a diluição específica até uma concentração final de aproximadamente 5 µg/ml. As células foram incubadas a 4°C durante 20 min na escuridão. Subsequentemente, as células foram lavadas 2 vezes com 2 mL de tampão para FACS. Até 15 mL de PBS para FACS foram adicionados. O Iodeto de Propídio (PI) foi adicionado a 1:100 (1 parte de PI para 100 partes de tampão PBS para FACS) e as células foram subsequentemente separadas em placas para PCR de 96 poços, contendo tampão de reação da PCR (vide abaixo) e centrifugadas

durante 2 min 400Xg antes das placas serem congeladas a -80°C. As células plasmáticas foram captadas na forma de CD43-positivas/CD-138 positivas como mostrado na *Figura 1*.

Ligação de pares de V_H e V_L cognatos

A ligação de sequências que codificam V_H e V_L foi realizada nas células isoladas capturadas como células plasmáticas, facilitando o pareamento de cognatos das sequências que codificam V_H e V_L. O procedimento utilizou um procedimento de PCR de duas etapas baseado e uma RT-PCR com extensão em sobreposição multiplex em uma etapa seguido por uma PCR aninhada. As misturas de iniciadores utilizadas no presente exemplo amplificam apenas as cadeias leves Kappa. Os iniciadores capazes de amplificar as cadeias leves Lambda poderiam, entretanto, ser adicionados na mistura de iniciadores multiplex e na mistura de iniciadores da PCR aninhada se desejado. Se iniciadores Lambda forem adicionados, o procedimento de separação deve ser adaptado de forma que células positivas para Lambda não sejam excluídas. O princípio para a ligação de sequências de V_H e V_L cognatas é ilustrado na *Figura 2*.

As placas para PCR de 96 poços produzidas foram descongeladas e as células separadas serviram como molde para a RT-PCR com extensão em sobreposição multiplex. O tampão de separação adicionado em cada poço antes da separação de células isoladas continha tampão de reação (OneStep RT-PCR Buffer; Qiagen), iniciadores para RT-PCR (vide a *Tabela 3*) e inibidor de RNase (RNasin, Promega). Este foi suplementado com OneStep RT-PCR Enzyme Mix (diluição de 25×; Qiagen) e mistura de dNTPs (200 µM cada) para a obtenção da concentração final em um volume de reação de 20 µL. As placas foram incubadas durante 30 min a 55°C para permitir a transcrição reversa do RNA de cada célula. Após a RT, as placas foram submetidas ao ciclo de PCR a seguir: 10 min a 94°C, 35×(40 s a 94°C, 40 s a 60°C, 5 min a 72°C), 10 min a 72°C.

As reações de PCR foram realizadas em um H20BIT Thermal cycler com um Peel Seal Basket para 24 placas de 96 poços (ABgene) para facilitar um alto rendimento. As placas para PCR foram armazenadas a -

20°C após os ciclos.

Para a etapa de PCR aninhada, as placas para PCR de 96 poços foram preparadas com a mistura a seguir em cada poço (reações de 20 µL) para a obtenção da concentração final determinada: 1× tampão FastStart (Roche), mistura de dNTPs (200 µM cada), mistura de iniciadores aninhados (vide a *Tabela 4*), DNA Polimerase Phusion (0,08 U; Finnzymes) e FastStart High Fidelity Enzyme Blend (0,8 U; Roche). Como molde para a PCR aninhada, 1 µL foi transferido das reações de PCR com extensão em sobreposição multiplex. As placas para PCR aninhada foram submetidas ao ciclo térmico a seguir: 35× (30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 90 s a 72°C), 10 min a 72°C.

As reações selecionadas aleatoriamente foram analisadas em um gel de agarose a 1% para verificar a presença de um fragmento de extensão em sobreposição de aproximadamente 890 pares de bases (pb).

As placas foram armazenadas a -20°C até o processamento adicional dos fragmentos de PCR.

Os repertórios de pares codificadores ligados de V_H e V_L provenientes da PCR aninhada foram agrupados, sem misturar os pares de doadores diferentes e foram purificados através de eletroforese preparatória em gel de agarose a 1%. A sequência que codifica a cadeia leve constante kappa humana foi unida através da extensão com sobreposição à região codificadora de V_L dos produtos da PCR agrupados dos pares codificadores ligados de V_H e V_L (Figura 3). A sequência que codifica a cadeia leve constante kappa humana foi amplificada partindo de um plasmídeo que contém a sequência codificadora de um anticorpo humano com uma cadeia leve kappa em uma reação contendo: Phusion Enzyme (2 U; Finnzymes), 1x tampão Phusion, mistura de dNTPs (200 µM cada), iniciador hKCforw-v2 e iniciador Kappa3' (*Tabela 5*) e o molde do plasmídeo pLL138 (10 ng/µL) em um volume total de 50 µL. A reação foi submetida ao ciclo térmico a seguir: 25× (30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 45 s a 72°C), 10 min a 72°C. O fragmento de PCR resultante foi purificado por eletroforese preparatória em gel de agarose a 1%.

Os fragmentos de PCR agrupados purificados de cada repertório foram unidos ao fragmento de PCR amplificado e purificado da região codificadora constante kappa humana (Apêndice 2) através da ligação a seguir por PCR com extensão em sobreposição (volume total de 50 µL) contendo: fragmento da região codificadora constante kappa humana (1,4 ng/µL), fragmento de PCR agrupado purificado (1,4 ng/µL), DNA Polimerase Phusion (0,5 U; Finnzymes) e FastStart High Fidelity Enzyme Blend (0,2 U; Roche), 1x tampão FastStart (Roche), mistura de dNTPs (200 µM cada), iniciador mhKCrev e iniciadores do conjunto mJH (vide a *Tabela 5*). A reação foi submetida ao ciclo térmico a seguir: 2 min a 95°C, 25×(30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C), 10 min a 72°C. O fragmento de PCR resultante (aproximadamente 1070 pb) foi purificado por eletroforese preparatória em gel de agarose a 1%.

Inserção de pares codificadores de V_H e V_L cognatos em um vetor de verificação

Para identificar anticorpos com especificidade de ligação ao EGFR, as sequências que codificam V_H e V_L obtidas foram expressas na forma de anticorpos de comprimento completo. Isto envolvia a inserção do repertório de pares codificadores de V_H e V_L em um vetor de expressão e a transfecção em uma célula hospedeira.

Um procedimento de clonagem de duas etapas foi empregado para gerar um repertório de vetores de expressão contendo os pares codificadores de V_H e V_L ligados. Estatisticamente, se o repertório de vetores de expressão contiver dez vezes tantos plasmídeos recombinantes quanto o número de produtos de PCR de V_H e V_L pareados cognatos utilizados para a produção do repertório de verificação, há uma probabilidade de 99% de que todos os pares de genes individuais estão representados. Assim, se fragmentos do gene V de extensão com sobreposição de 400 forem obtidos, um repertório de pelo menos 4000 clones foi gerado por verificação.

Sucintamente, o produto da PCR purificado dos repertórios de pares codificadores de V_H e V_L ligados, unidos à região codificadora constante kappa humana, foi clivado com as DNA endonucleases *Xho*I e *Not*I nos

sítios de reconhecimento introduzidos nos términos dos produtos da PCR. Os produtos clivados e purificados foram ligados em um vetor de expressão de IgG de mamífero digerido com *Xho*I/*Not*I, OO-VP-002 (Figura 4) através de procedimentos de ligação padronizados. A mistura de ligação foi submetida à eletroporação em *E. coli* e adicionada em placas de 2×YT contendo o antibiótico apropriado e incubadas a 37°C durante a noite. O repertório de vetores amplificado foi purificado das células recuperadas das placas utilizando métodos de purificação de DNA padronizadas (Qiagen). Os plasmídeos foram preparados para a inserção de fragmentos de promotor-líder através da clivagem utilizando as endonucleases *Asc*I e *Nhe*I. Os sítios de restrição para estas enzimas estavam localizados entre os pares de genes que codificam V_H e V_L. Após a purificação do vetor, um fragmento de promotor-líder de mamífero bidirecional digerido com *Asc*I-*Nhe*I foi inserido nos sítios de restrição de *Asc*I e *Nhe*I através de procedimentos de ligação padronizados. O vetor ligado foi amplificado em *E. coli* e o plasmídeo foi purificado utilizando métodos padronizados. O repertório gerado de vetores de verificação foi transformado em *E. coli* através de procedimentos convencionais. As colônias obtidas foram consolidadas em placas principas de 384 poços e armazenadas. O número de colônias dispostas excedia o número de produtos da PCR de início em pelo menos 3 vezes, fornecendo assim uma probabilidade de 95% de presença de todos os pares de genes V individuais.

Verificação em relação à ligação ao domínio extracelular do EGFR

Em geral, a verificação era feita na forma de um procedimento de duas etapas. As bibliotecas de anticorpos foram verificadas em relação à reatividade à proteína EGFR recombinante em ELISA após o qual o FMAT (FLISA) foi utilizado como uma abordagem baseada em células, com a linhagem de células NR6wtEGFR, para a detecção de anticorpos para EGFR que se ligam ao EGFR expresso na superfície celular. Para as bibliotecas 101 e 108/109 (Tabela 2) o ELISA foi realizado com EGFR recombinante representando o domínio extracelular do EGFR.

Sucintamente para o ELISA, placas maxisorb da Nunc (no de

cat 464718) foram revestidas com 1 µg/mL de proteína (produzida no local), diluído em PBS a 4°C durante a noite. Antes do bloqueio em 50 µL de 2%-Leite-PBS-T, as placas foram lavadas uma vez com PBS + 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas foram lavadas uma vez com PBS-T, 20 µL de 2%-leite-PBS-T e 5 µL dos sobrenadantes dos transfectantes FreeStyle CHO-S (vide abaixo) foram adicionados e incubados durante 1 ½ hora à temperatura ambiente após o que as placas foram lavadas uma vez com PBS-T 20 µL por poço. O anticorpo secundário (HRP-Goat-anti-human IgG, Jackson, no de cat 109-035-097) diluído 1:10000 em 2% de leite-PBS-T foi adicionado para detectar os anticorpos ligados aos poços e foi incubado durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez em PBS-T antes da adição de 25 µL de substrato (Kem-en-tec Diagnostics, no de cat 4390) que foram incubados durante 5 min. 25 µL de ácido sulfúrico a 1 M foram adicionados após a incubação para interromper a reação. O sinal específico foi detectado em uma leitora de ELISA em 450 nm.

Para a detecção por FMAT baseada em células dos anticorpos anti-EGFR, SKBR-3 (ATCC #HTB-30) ou NR6wtEGFR (Welsh e outros, 1991, J Cell Biol, 114, 3, 533-543) as células foram mantidas em meio de cultura como descrito. As células foram contadas e diluídas até 125.000 células/mL com o anticorpo IgG anti-humano de cabra conjugado (H-L) Alexa-647 (Molecular probes Nº A21445, lote Nº 34686A) diluído 1:40.000. Um total de 20 µL desta suspensão foi transferido para placas Nunc de fundo transparente de 384 poços. Subsequentemente, 10 µL de sobrenadante de transfecção foram adicionados às células. O sinal de FMAT proveniente da reação foi medido após 6-10 horas de incubação.

Os dados da verificação indicam que 221 (4,8%) dos clones totais eram positivos no ELISA. 93 (2,0%) de tais clones também eram positivos no FMAT. No total, 220 (4,8%) dos clones eram positivos no FMAT e dentre estes 127 (220-93) eram exclusivamente positivos para o antígeno de superfície celular. A biblioteca 111 foi verificada de uma maneira similar, mas uma vez que o procedimento de imunização foi realizado para gerar anticorpos específicos para o EGFRvIII receptor EGFR mutante de deleção, as ve-

rificações por ELISA incluíam ensaios para detectar tanto EGFR do tipo selvagem quanto EGFRvIII. Sete clones foram identificados como sendo específicos para o EGFRvIII no ELISA e, de forma interessante, tais clones eram negativos em relação à coloração de células que expressam wtEGFR no FMAT. 13 clones foram identificados como sendo positivos para o wtEGFR no FMAT e no ELISA, mas não para o EGFRvIII, que eram exclusivos para esta biblioteca comparados com os das bibliotecas 101 e 108/109. Todos os clones positivos no ELISA foram selecionados para análise adicional.

Análise de sequência e seleção de clones

Os clones identificados como específicos ao EGFR no ELISA foram recuperados das placas principais originais (formato de 384 poços) e consolidados em novas placas. O DNA foi isolado dos clones e submetido ao sequenciamento do DNA dos genes V. As sequências foram alinhadas e todos os clones individuais foram selecionados. Vários alinhamentos das sequências obtidas revelaram a singularidade de cada clone particular e permitiram a identificação de anticorpos individuais. Após a análise de sequência de 220 clones, foram identificados 70 grupos de sequências de anticorpos geneticamente distintos. Cada grupo de sequências relacionadas foi provavelmente produzido através de hipermutações somáticas de um clone precursor comum. Em geral, um até dois clones de cada grupo foram escolhidos para a validação da sequência e da especificidade. As sequências de sequências variáveis de anticorpos selecionados são mostradas no Apêndice 1. As sequências de nucleotídeos incluem sítios de restrição em ambos os terminais. Consequentemente, as sequências de aminoácidos traduzidas correspondentes (utilizando o terceiro quadro de leitura da sequência de DNA) incluem no N-terminal, dois aminoácidos que não fazem parte das sequências de VH e VL de acordo com a definição de IMGT (Lefranc e outros (2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev. Comp Immunol 27, 55-77). Todas as sequências de VL mostradas incluem a mesma região Constante Kappa humana, que começa com os aminoácidos -TVAAP- e termina no C-terminal -NRGEC. Para as finalidades da presente invenção, o termo

sequência de VL quando refere-se a um anticorpo específico exclui a região Constante Kappa e os dois aminoácidos N-terminais (LA-). O termo sequência de VH quando refere-se a um anticorpo específico exclui os dois aminoácidos N-terminais (RA-).

Validação da sequência e da especificidade

Para validar os clones que codificam anticorpos, o plasmídeo de DNA foi preparado e a transfecção de células CHO-S Freestyle (Invitrogen) na escala de 2 mL foi realizada para expressão. O sobrenadante foi coletado 96 horas após a transfecção. Os níveis de expressão foram estimados com ELISA anti-IgG padronizado e a especificidade foi determinada através de ELISA específico para EGFR e EGFRvIII. Foi mostrado que 85% dos clones possuíam a especificidade e a sequência corretas.

Verificação em relação aos efeitos antiproliferativos

Os danos celulares resultarão inevitavelmente na perda da capacidade da célula de manter e fornecer energia para a função celular metabólica e para o crescimento. Os ensaios de atividade metabólica baseiam-se nesta premissa. Geralmente estes medem a atividade mitocondrial. O Reagente de Proliferação de Célula (Cell Proliferation Reagent) WST-1 (Roche Nº de Cat. 11 644 807 001) é um substrato pronto para uso que mede a atividade metabólica de células viáveis. Assume-se então que a atividade metabólica se correlaciona com o número de células viáveis. Neste exemplo o ensaio com o WST-1 foi utilizado para medir o número de células metabolicamente ativas após o tratamento com sobrenadantes de culturas de células que contêm anticorpos anti-EGFR diferentes.

Antes da realização do ensaio com o WST-1, volumes diferentes de sobrenadantes de 2 mL (0, 10, 25, 50 e 150 µL) foram transferidos para poços apropriados em uma placa de 96 poços.

Células HN5 foram então lavadas com 1xPBS e separadas através de tratamento com tripsina com 3 mL de solução de tripsina. 17 mL de meio completo foram então adicionados e as células foram centrifugadas a 300xg (1200 rcf) durante 5 min. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em DMEM + 0,5% de FBS. As células foram contadas e

sua concentração foi ajustada e 1500 células foram adicionadas nos poços com os sobrenadantes de forma que cada poço contivesse 200 µL de meio no total. As placas foram incubadas durante 4 dias em uma incubadora umedecida a 37°C. Então 20 µL do reagente WST-1 foram adicionados por poço e as placas foram incubadas durante uma hora a 37°C. As placas foram então transferidas para um agitador de placas orbital e mantidas durante mais uma hora. A absorbância foi medida em 450 e 620 nm (comprimento de onda de referência) em uma leitora de ELISA. A diferença nos níveis de células metabolicamente ativas (MAC) foi calculada como a percentagem dos sobrenandantes de controle como a seguir:

$$\%MAC = \left(1 - \frac{(OD\ exp. - ODmeio)}{(OD\ não\text{-}tratado - ODmeio)}\right) \times 100$$

Estes valores foram então utilizados como a base para uma análise supervisionada de grupo hierárquico (agrupado com base na reatividade no ELISA) realizada utilizando os softwares livres Cluster e TreeView.

É preferível ser capaz de selecionar anticorpos funcionais em um estágio inicial no processo de seleção de anticorpos. Os sobrenadantes de cultura de 83 transfecções de 2 mL foram utilizados para verificar funções inibidoras do crescimento em um ensaio de proliferação realizado utilizando células HN5 em 0,5% de FBS. Os resultados foram visualizados através da análise simples de grupos hierárquicos. Como pode ser observado na análise de grupos (Figura 5) foi observado que um número de sobrenadantes diminuía o número de células HN5 metabolicamente ativas (cinza-escuro) de uma maneira dependente da concentração (Grupo 2). Similarmente, alguns sobrenadantes aumentavam o número de células HN5 metabolicamente ativas (cinza-claro) de uma maneira dependente da concentração (Grupos 1, 3 e 4). Uma observação interessante era que os sobrenadantes, que diminuíam o número de células HN5 metabolicamente ativas, tinham reatividade 2 (setas em preto) enquanto que os sobrenadantes que aumentavam o número de células HN5 metabolicamente ativas tinham reatividade 1 (setas em cinza). Os sobrenadantes com reatividade 2 eram positivos nos ELISAs tan-

to para wtEGFR quanto para EGFRvIII, enquanto que os sobrenadantes com reatividade 1 tinham apenas reatividade em relação ao wtEGFR. Assim, tais análises podem fornecer relações entre a reatividade do anticorpo no ELISA e a funcionalidade nos ensaios celulares.

Reparo de clones

Quando é utilizada uma abordagem de PCR multiplex, um certo grau de iniciação cruzada intra e inter família do gene V é esperado devido à degeneração dos iniciadores e ao alto grau de homologia. A iniciação cruzada introduz aminoácidos que não ocorrem naturalmente na estrutura da imunoglobulina com várias consequências potenciais, por exemplo, alterações estruturais e maior imunogenicidade, tudo resultando em uma menor atividade terapêutica.

Para eliminar estas desvantagens e para garantir que os clones selecionados espelham a resposta imunológica humoral natural, tais mutações de iniciação cruzada foram corrigidas em um processo chamado reparo de clones.

Na primeira etapa do processo de reparo de clones, a sequência de V_H foi amplificada através da PCR com um conjunto de iniciadores contendo a sequência que corresponde ao gene V_H do qual o clone de interesse é originado, corrigindo assim quaisquer mutações introduzidas pela iniciação cruzada. O fragmento de PCR foi digerido com *Xho*I e *Asc*I e ligado de volta no vetor de expressão de mamífero digerido com *Xho*I/*Asc*I (Figura 4) utilizando procedimentos de ligação convencionais. O vetor ligado foi amplificado em *E. coli* e o plasmídeo foi purificado através de métodos padronizados. A sequência de V_H foi sequenciada para verificar a correção e o vetor foi digerido com *Nhe*I/*Not*I para prepará-lo para a inserção da cadeia leve.

Na segunda etapa a cadeia leve completa foi amplificada através da PCR com um conjunto de iniciadores contendo a sequência que corresponde ao gene V_L do qual o clone de interesse é originado, corrigindo assim quaisquer mutações introduzidas pela iniciação cruzada. O fragmento de PCR foi digerido com *Nhe*I/*Not*I e ligado no vetor contendo V_H preparado

anteriormente. O produto de ligação foi amplificado em *E. coli* e o plasmídeo foi purificado através de métodos padronizados. Subsequentemente, a cadeia leve foi sequenciada para verificar a correção.

No caso em que a região constante Kappa de um clone selecionado contém mutações, introduzidas durante a amplificação dos genes, esta é substituída por uma região constante não-mutada. Isto é feito em uma PCR com sobreposição em que o gene V_L reparado (amplificado sem a região constante) foi fundido com uma região constante com a sequência correta (obtida em uma PCR separada). A sequência inteira é amplificada e clonada no vetor contendo V_H como descrito anteriormente e a cadeia leve reparada é sequenciada para verificar a correção.

Tabela 2: Programas de imunização utilizados para gerar material de partida para a clonagem de anti-EGFR

Programa, Grupo de camundongo	Cepa	Injeção 1	Injeção 2	Injeção 3	Injeção 4	Término
101	Balb/c	Dia 1 25 µg de rhEGFR (R&D systems 1095-ER) CFA s.c.	Dia 35 25 µg de rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c	Dia 56 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c	Dia 70 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c	Dia 73
108	Balb/c	Dia 1 $1x10^7$ células HN5 CFA i.p.	Dia 28 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	Dia 42 $1x10^7$ células HN5 IFA i.p.	Dia 56 25 µg de rhEGFR*, (Symphogen) IFA s.c.	Dia 59
109	Balb/c	Dia 1 $1x10^7$ células HN5 CFA i.p.	Dia 28 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	Dia 42 $1x10^7$ células HN5 IFA i.p.	Dia 56 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) PBS i.v.	Dia 59
111	Balb/c	Dia 1 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) CFA s.c.	Dia 28 25 µg de rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	Dia 42 25 µg de rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	Dia 56 25 µg de rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	Dia 59
118	Balb/c	Dia 1 $1x10^7$ células HN5 CFA i.p.	Dia 29 100 µg de rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	Dia 44 $1x10^7$ células HN5 IFA i.p.	Dia 58 25 µg de rhEGFR, (Sigma E3641) IFA s.c.	Dia 61
119	C57B	Dia 1 $1x10^7$ células HN5 CFA i.p.	Dia 29 100 µg de rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	Dia 44 $1x10^7$ células HN5 IFA i.p.	Dia 58 25 µg de rhEGFR, (Sigma E3641) IFA s.c.	Dia 61

Tabela 3: Mistura de iniciadores para extensão em sobreposição multiplex através de RT-PCR

Nome do iniciador	Conc. (nM)	Sequência	SEQ ID
mHCrev1	0,2	GACSGATGGGCCCTTGGTGG	1
mKappar1	0,2	GCTGTAGGTGCTGTCTTTGC	2
mVH set			
mVH A	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTCCARCTGC ARCAGYCTG	3
mVH B	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCGARGTGMAGCTKG TKGAGTC	4
mVH C	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTGCAGCTKM AGGAGTC	5
mVH 8	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGGTTACTCTGA AAGAGTC	6
mVH 9	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGATCCAGTTGG TGCAGTCTG	7
mVK set			
mVK D	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAYATC CAGATGACHCARWCT	8
mVK E	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCRACATT GTGMTGACHCAGTC	9
mVK F	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCSAMATT GTKCTSACCCARTCTC	10
mVK 1-	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATRTT GTGATGACBCARRCT	11

W=A/T, R=A/G, S=G/C, Y=C/T, K=G/T, M=A/C, H=ACT, B=GCT; Conc. - concentração final.

Tabela 4: Conjunto de iniciadores aninhados

Nome do iniciador	Conc. (nM)	Sequência	SEQ ID
mHCrev1-ext	0,2	GGACAGGGMTCCAKAGTTCCADKT	16
hmJK set			
hmJK1-	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTG ATTTCCAGCTTGGTG	17
hmJK2-	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTA TTTCCAGCTTGGTC	18
hmJK4-	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTA TTTCCAACTTTGTC	19
hmJK5-	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTC AGCTCCAGCTTGGTC	20

K=G/T, M=A/C,D=AGT; Conc. - concentração final.

Tabela 5: Conjunto de iniciadores de ligação da constante Kappa

Iniciador	Conc. (nM)	Sequência	SEQ ID
Amplificação da constante kappa humana			
hKCforw-v2	0,2	GAACTGTGGCTGCACCATCTGTC	21
Kappa3'	0,2	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTA ACACTCTCCCCTGTTG	22
Ligação através da extensão em sobreposição			
mhKCrev	0,2	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTA ACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT	23
Conjunto mJH			
mJH1	0,2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCGTGG TCCC	12
mJH2	0,2	GGAGGCGCTCGAGACTGTGAGAGTGG TGCC	13
mJH3	0,2	GGAGGCGCTCGAGACAGTGACCAGAG TCCC	14
mJH4	0,2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGG TTCC	15

EXEMPLO 2: Produção de anticorpos anti-EGFR em mamíferos

O sistema de expressão FreeStyle MAX CHO (Invitrogen) foi utilizado para a expressão transitória de anticorpos anti-EGFR. Os anticorpos foram expressos em um volume de 200-2000 mL.

Aproximadamente 24 horas antes da transfecção, as células CHO-S foram submetidas a passagens para atingir uma concentração de células de 0,5 x 10^6 células/mL. O plasmídeo (1,25 µg por mL de meio de cultura de células) foi diluído no meio isento de soro OptiPro e misturado com uma solução do reagente FreeStyle MAX Transfection como recomendado pelo fornecedor. Os reagentes de transfecção foram transferidos para a cultura de células e o sobrenadante foi coletado 6 dias depois.

Os anticorpos expressos foram purificados do sobrenadante de cultura utilizando uma etapa de cromatografia por afinidade empregando uma coluna de Proteína A-Sepharose (MabSelect Sure, GE Health Care) para a purificação de moléculas de IgG1. Os anticorpos foram eluídos da coluna utilizando 0,1 M de Glicina, 2.7. As frações contendo os anticorpos, determinadas através de medidas da absorbância em 280 nm, foram agrupadas e submetidas à diálise contra 5 mM de acetato de sódio, 150 mM de NaCl, pH 5. As amostras de anticorpos purificados foram testadas em relação à presença de endototoxina através do ensaio de LAL.

EXEMPLO 3: Determinação das especificidades do epitopo

ELISA de competição com anticorpos de referência

Utilizando anticorpos de referência que se ligam a domínios de EGFR conhecidos como publicado em (J.R. Cochran e outros, JIM 2004: 287; 147-158), foi desenvolvido um ELISA de competição que podia distinguir entre os epitopos de ligação de anticorpos anti-EGFR através da incubação com um reagente secundário que era específico para a região Fc humana de anticorpos Anti-EGFR e exibindo nenhuma reatividade cruzada ao Fc da IgG de camundongo ou de rato. O ELISA foi adaptado das descrições publicadas em Ditzel e outros, 1995, The Journal of Immunology, Vol 154, Edição 2 893-906.

Um ELISA que bloqueia os epitopos foi realizado através da di-

luição do antígeno do receptor EGFR de comprimento completo até 0,5 µg/mL em PBS; e revestindo 50 µL/poço de ELISA durante a noite a 4°C. Na manhã seguinte, os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e bloqueados durante uma hora com PBS-T-1% de BSA à temperatura ambiente seguido pela lavagem duas vezes em PBS-T. Depois 25 µL de mAbs de referência murino ou de rato foram adicionados aos poços de ELISA independentes em uma diluição conhecida dos experimentos anteriores para fornecer ligação ao antígeno máxima de 200 vezes. Após 15 min, 25 µL de anticorpos Anti-EGFR foram adicionados em uma concentração de 2 µg/mL nos poços pré-incubados com os anticorpos de referência ou nos poços contendo 25 µL de PBS. Isto forneceu uma concentração final de 1 µg/mL de anticorpo Anti-EGFR e uma ligação ao antígeno máxima de 100 vezes dos anticorpos de referência após a mistura. Os anticorpos foram incubados durante 45 min à temperatura ambiente após os quais os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T. Um conjugado de HRP anti-IgG Humana de Cabra secundário foi diluído 1:3000 e 50 µL foram adicionados em cada poço seguidos por uma incubação de 30 min à temperatura ambiente. Finalmente os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T e as placas foram reveladas através da adição de 50 µL/poço de TMB e lidas em 620 nm a cada 5-15-30 min. O grau de inibição foi calculado partindo da fórmula: % de inibição = (1-(DO com competição/DO sem competição (PBS))) x 100,

Reagentes do ELISA:

1) Tampão de revestimento: 1 x PBS; Gibco cat:20012-019

2) Antígenos: EGFR de comprimento completo do tipo selvagem purificado de células A431; Sigma E3641

3) Placa de ELISA: NUNC Maxisorp; cat: 442404

4) Tampão de bloqueio/diluição: 1% de BSA em PBS-T (PBS-T-1% de BSA)

5) Tampão de lavagem: 1x PBS/0,05% de Tween 20 (PBS-T)

6) Controle positivo: Erbitux (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemanha, Catálogo #: 018964; Cetuximab), Vectibix (Amgen Inc, One Amgen Center Drive, Thousand Oaks CA 91320-1799, USA, Cat # 3241400;

Panitumumab)

7) Anticorpos de referência:

- ICR10 (de rato), Abcam, Ab231
- 199.12 (murino), Lab Vision Ab-11, MS-396-PABX
- EGFR.1 (murino), Lab Vision Ab-3, MS-311-PABX
- H11 (murino), Lab Vision Ab-5, MS-316-PABX
- B1D8 (murino), Lab Vision Ab-16, MS-666-PABX
- 111.6 (murino), Lab Vision Ab-10, MS-378-PABX
- 225 (murino), Lab Vision Ab-2, MS-269-PABX
- 528 (murino), Lab Vision Ab-1, MS-268-PABX

8) Conjugado de HRP anti-IgG Humana de Cabra; Serotec, Star 106P

9) TMB Plus; KemEnTec, cat # 4390L

10) 1 M de H_2SO_4

O resultado do ELISA de competição é mostrado na Figura 6. Os ensaios de ELISA de competição foram empregados para classificar os sobrenadantes de anticorpos Anti-EGFR de acordo com a especificidade ao domínio dos anticorpos de referência utilizados produzidos contra do domínio extracelular do EGFR. Valores de inibição de 50 - 100% foram considerados como uma indicação de competição significativa entre pares de anticorpos que se ligam a epitopos sobrepostos ou a epitopos em proximidade íntima no antígeno, enquanto que valores de inibição abaixo de 50% indicavam que os epitopos reconhecidos pelos pares de anticorpos não estavam em proximidade íntima resultando em um menor impedimento estérico. Foi observado que os anticorpos Anti-EGFR se ligam a uma variedade de epitopos no ECD do EGFR incluindo os domínios I, II & III. Para alguns anticorpos esta análise não podia distinguir se o mAb específico estava direcionado contra o domínio I ou o domínio II. Tais especificidades foram marcadas como domínio I/II. Ainda alguns anticorpos pareciam se ligar a epitopos exclusivos que não podiam ser adicionalmente deduzidos no ELISA de competição empregado (Por exemplo, os clones 1229 & 1320, figura 6). É possível que alguns destes anticorpos sejam direcionados contra o domínio IV para o

qual não há quaisquer reatividades de anticorpo de referência. De forma interessante, os anticorpos para o domínio III podiam ser adicionalmente divididos em quatro subgrupos com base nos padrões de competição diferentes obtidos com os anticorpos de referência murinos testados contra este domínio. O grupo I consistia somente no mAb 992 que foi observado que competia pela ligação com os anticorpos de referência Ab1 & Ab2. O grupo II consistia nos mAbs 1024 & 1042 que eram ambos derivados do mesmo rearranjo de Ig e consequentemente exibiam homologia de sequência muito próxima no nível de DNA e de aminoácidos. Foi observado que estes dois anticorpos competiam somente pela ligação com o Ab2. O grupo III consistia nos mAbs 1030, 1208 & 1277 que competiam pela ligação com os anticorpos de referência Ab1, Ab5 & Ab10. Finalmente, o grupo IV consistia no mAb 1254, que competia pela ligação com todos os anticorpos de referência Ab1, Ab2, Ab5 & Ab10 para o domínio III utilizados.

Análise de competição para epitopos distintos com anticorpos de referência ou da mesma espécie utilizando a tecnologia de ressonância de plasmônio de superfície

A análise de SPR foi realizada em uma máquina Biacore 3000 contendo quatro células de fluxo. Um chip CM5 Biacore foi conjugado com anticorpo anti-His policlonal com 10.000 unidades de Ressonância (Ru) às células de fluxo 1 - 4 de acordo com as instruções do fabricante. Utilizando uma vazão de 5 µL/min, 15 µL de 6xHis EGFR ECD em uma concentração de 20 µg/mL foram injetados e capturados em todas as quatro células de fluxo às quais o anticorpo policlonal anti-His foi conjugado. Imediatamente após a injeção do antígeno, a ligação máxima do mAb Anti-EGFR sem competição foi estabelecida em cada célula de fluxo durante uma corrida de referência. Sucintamente, 5 µL de anticorpo em uma concentração de 40 µg/mL foram injetados em todas as células de fluxo com o EGFR capturado seguido pela extração do complexo anticorpo/antígeno com uma lavagem ácida com pH baixo (tampo de contato de 10 s com 10 mM de Glicina-HCl, pH 2). Após a determinação da ligação máxima do anticorpo Anti-EGFR a cada célula de fluxo, foi realizada uma corrida de competição durante o mesmo

ciclo de Biacore. As células de fluxo foram primeiramente saturadas com o antígeno do ECD do EGFR seguidas pela injeção de anticorpos de referência diferentes ou de anticorpos Anti-EGFR em células de fluxo separadas utilizando as mesmas condições de saturação do antígeno como descrito anteriormente. Esta etapa foi imediatamente seguida por uma segunda injeção de anticorpo Anti-EGFR pela célula de fluxo saturada com o antígeno de EGFR e o anticorpo de competição para minimizar a dissociação do antígeno ou bloquear o anticorpo. Então os complexos anticorpo/antígeno foram extraídos com uma lavagem ácida com pH baixo (tempo de contato de 10 s com 10 mM de Glicina-HCl, pH 2) e o ciclo completo começando com a corrida de referência foi repetido com um novo anticorpo Anti-EGFR. O grau de inibição de anticorpos Anti-EGFR testados foi determinado através da comparação do valor máximo de Ru do anticorpo Anti-EGFR individual antes e depois da competição através da introdução de pontos de informação registrados dois segundos antes e depois da injeção de cada amostra. Um exemplo de um ciclo de Biacore é mostrado na Figura 7.

Reagentes:

1. Chip CM5; Biacore, Nº de Cat. BR-1000-14
2. NHS; Biacore BR-1000-50
3. EDC; Biacore BR-1000-50
4. 10 mM de Tampão acetato pH 4,5; Biacore, Nº de Cat. BR-1003-50
5. Anticorpo Tetra-His (isento de BSA); Qiagen, Nº de Cat. 34670
6. Etanolamina, 1,0 M pH 8,5; Biacore BR-1000-50
7. 10 x tampão de corrida de HBS-EP: 0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% v/v de Tensoativo P20
8. Antígeno: Domínio extracelular do EGFR humano recombinante produzido no local com 6xHis.
9. 10 mM de Glicina HCl pH 2,0
10. Anticorpos de referência:

- ICR10 (de rato), Abcam, Ab231

- 199.12 (murino), Lab Vision Ab-11, MS-396-PABX
- EGFR.1 (murino), Lab Vision Ab-3, MS-311-PABX
- H11 (murino), Lab Vision Ab-5, MS-316-PABX
- B1D8 (murino), Lab Vision Ab-16, MS-666-PABX
- 111.6 (murino), Lab Vision Ab-10, MS-378-PABX
- 225 (murino), Lab Vision Ab-2, MS-269-PABX
- 528 (murino), Lab Vision Ab-1, MS-268-PABX

Para confirmar a análise de epitopo obtida no ELISA de competição e para realizar uma análise de epitopo adicional através de competição entre pares de anticorpos Anti-EGFR da mesma espécie, foi estabelecido um ensaio de competição baseado na ligação ao anticorpo medida em tempo real através da ressonância de plasmônio de superfície. O mapa de epitopos obtido dos clones Anti-EGFR testados contra o conjunto de anticorpos de referência é mostrado na Figura 8 abaixo. Os valores de inibição de 50 - 100% foram considerados como uma indicação de competição significativa entre pares de anticorpos que se ligam a epitopos sobrepostos ou a epitopos em proximidade íntima no antígeno, enquanto que os valores de inibição abaixo de 50% indicavam que os epitopos reconhecidos pelos pares de anticorpos não estavam em proximidade íntima resultando em um menor impedimento estérico. Os valores de inibição abaixo de 25% não foram incluídos na análise para os epitopos sobrepostos, porque foi julgado que estes representavam inibição não significativa. Foi observado que todos os anticorpos testados exceto o 1320 competiam com um ou mais dos anticorpos de referência empregados, indicando que o 1320 era direcionado contra um epitopo desconhecido para o qual não há quaisquer reatividades de anticorpo de referência. Os anticorpos completamente humanos ou humanizados Vectibix e Erbitux foram incluídos na análise e foi descoberto que se ligavam a epitopos sobrepostos. Os dados obtidos tanto do ELISA competitivo quanto da análise de SPR competitiva geralmente se correlacionavam bem em relação à especificidade ao domínio estabelecida dos anticorpos Anti-EGFR. Entretanto, pequenas diferenças no padrão de competição entre os anticorpos de referência individuais eram algumas vezes observadas nos dois ensaios,

talvez devido ao fato de que o ensaio de ELISA de competição empregava o antígeno do receptor EGFR de comprimento completo enquanto que o ensaio de competição de SPR utilizava o EGFR do domínio extracelular recombinante.

Após o mapeamento de epitopos de anticorpos Anti-EGFR ter sido confirmado em dois ensaios de competição diferentes, a análise de competição de combinações da mesma espécie de pares de anticorpos Anti-EGFR foi verificada para determinar quais pares de anticorpos estavam reconhecendo epitopos distintos e se os pares de anticorpos que reconheciam epitopos sobrepostos podiam ser adicionalmente divididos em grupos de epitopos. O resultado desta análise é mostrado na Figura 9. Novamente nesta análise, os valores de inibição de 50 - 100% foram considerados como uma indicação de competição significativa entre pares de anticorpos que se ligam a epitopos sobrepostos. Este critério parecia válido, uma vez que os anticorpos testados contra eles mesmos e consequentemente que reconheciam epitopos sobrepostos completos resultavam em valores entre 70% - 100% de inibição como mostrado na figura 9. Ainda, esta observação ilustrava que a dissociação do antígeno ou de pares de anticorpos dentro do período de tempo da análise não parecia ter um impacto sobre o resultado do experimento para os anticorpos testados. Através do agrupamento dos anticorpos de acordo com a especificidade ao domínio ECD do EGFR presumido determinada nas seções anteriores, foi observado que os anticorpos que se ligam exclusivamente ao domínio I ou ao domínio I ou II (I/II) se agrupam principalmente com membros de anticorpos com as mesmas especificidades e não com membros de anticorpos que reconhecem o domínio III. Similarmente, foi observado que os anticorpos para o domínio III competem pela ligação somente com membros de anticorpos que reconhecem o domínio III e não com anticorpos que reconhecem o domínio I ou I/II do EGFR. Embora tenha sido observado que os dois anticorpos para o domínio III 1024 & 1042 derivados do mesmo rearranjo de Ig reconhecem epitopos sobrepostos, foi descoberto que as combinações em pares de qualquer um de 1024 ou 1042 com qualquer um de 992 ou 1030 não eram importantes para resultar em

competição significativa. Consequentemente, foi concluído que os anticorpos 992, 1030 & 1024/1042 reconheciam três epitopos não-sobrepostos no domínio III do ECD do EGFR. Finalmente, foi observado que o mAb 1320 competia pela ligação com os mAbs 1024 e 1449, ambos direcionados contra o domínio III e não outros anticorpos para o domínio III testados (competição de 1320 com 1042 não determinada). Consequentemente, foi assumido que o mAb 1320 estava se ligando na periferia do domínio III no domínio extracelular do EGFR. Uma visão geral das especificidades do epitopo pode ser observada na figura 10, onde são ilustrados mapas de epitopos de anticorpos direcionados contra o domínio I, I/II ou III do ECD do EGFR.

Após a descoberta de que as combinações em pares de 992, 1030 & 1024/1042 não resultavam na competição significativa de anticorpos que é determinada através da SPR, novos experimentos de Biacore foram planejados para verificar quantos anticorpos que podiam se ligar ao antígeno do receptor simultaneamente. Em primeiro lugar foi investigado qual impacto a saturação do Domínio III com os três anticorpos 992, 1024 e 1030 teria sobre a ligação de anticorpos direcionados contra outras especificidades do EGFR que não estavam no domínio III. O resultado desta análise é mostrado na Figura 11A. As inibições de anticorpos isolados foram estabelecidas através do teste dos mesmos em combinações com o anticorpo isolado ou com misturas de anticorpos de até três anticorpos gerados através da adição sequencial de um anticorpo extra durante cada ciclo de Biacore. Para garantir o bloqueio completo do epitopo reconhecido, os anticorpos foram testados em concentrações individuais de 40 μg/mL. Como mostrado na figura 11A, foi observado que os três anticorpos para o domínio III 992, 1024 & 1030 se ligavam simultaneamente ao receptor sem qualquer inibição da ligação. Os valores negativos de inibição observados que aumentam para cada anticorpo adicionado sugeriu ainda uma sinergia na ligação para o anticorpo seguinte adicionado. De maneira importante, uma vez que o domínio III foi incubado com os três anticorpos, outros anticorpos direcionados contra epitopos não-sobrepostos no domínio I/II (mAb 1261), no domínio I (1347) ou uma especificidade desconhecida (1361) pareciam estar se ligando sem o

bloqueio do epitopo da mistura dos três mAb. Ainda, estes anticorpos testados tinham valores negativos de inibição baixos indicando que estavam se ligando melhor após a saturação do receptor com a mistura dos três mAb. Consequentemente, este experimento sugeria que os seis anticorpos testados podiam se ligar ao ECD do EGFR simultaneamente. Para testar adicionalmente este fenômeno observado, uma mistura de anticorpos consistindo em todos os anticorpos testados (1261, 1347, 992, 1024, 1030 & 1361) foi produzida e testada em relação à inibição de cada anticorpo da amostra individual na mistura. As misturas de anticorpos em que o anticorpo da amostra testado não tinha sido incluído também foram testadas para servir como um controle positivo. Como apresentado na figura 11B/C, foi observado que todos os seis anticorpos testados eram inibidos de 80 - 116% quando testados em relação à ligação ao receptor de EGF incubado com a mistura completa de anticorpos. Entretanto, quando anticorpos da amostra individuais foram removidos desta mistura, não foi observada uma inibição significativa do anticorpo da amostra particular, ilustrando que os anticorpos na mistura estavam bloqueados apenas em relação à ligação ao receptor de EGF por si mesmos. Este experimento ilustrou claramente que pelo menos seis anticorpos que reconhecem epitopos não-sobrepostos podem ser ligar ao EGFR simultaneamente. Como um experimento final, foi investigado se outros anticorpos direcionados contra o domínio I (1284), I/II (1257) ou grupo de especificidade desconhecida (1183, 1255) poderiam se ligar ao EGFR, quando este foi incubado com a mistura de seis anticorpos. Como apresentado na figura 11D, nenhum dos anticorpos testados era capaz de se ligar de forma significativa ao EGFR após a incubação prévia com a mistura de seis anticorpos. Isto pode ser devido ao fato de que a coleção de anticorpos não inclui anticorpos contra qualquer um dos sítios deixados desocupados pelos seis anticorpos ligados. Alternativamente, é possível que na realidade todos os sítios nos domínios testados estivessem bloqueados com o anticorpo.

Tabela 6: Anticorpos disponíveis comercialmente com especificidades documentadas contra os domínios extracelulares do EGFR.

Clone	Espécie	Domínio I	Domínio II	Domínio III
ICR10	Rato	X		
199.12/Ab11	Camundongo	X		
EGFR.1/Ab3	Camundongo		X	
H11/Ab5	Camundongo			X
111.6/Ab10	Camundongo			X
528/Ab-1	Camundongo			X
225/Ab-2	Camundongo			X

EXEMPLO 4: Inibição da ativação do EGFR

Determinação do bloqueio mediado por anticorpo da ligação ao ligante de EGF ao receptor EGFR por ELISA competitivo

Para verificar quais anticorpos Anti-EGFR testados se ligavam ao receptor EGFR e simultaneamente bloqueavam a ligação do ligante de EGF Biotinilado, os poços de ELISA foram revestidos com 80 µL/poço de EGFR de comprimento completo em uma concentração de 0,5 µg/mL em PBS durante a noite e 4°C. Na manhã seguinte os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e bloqueados durante uma hora com 150 µL de PBS-T-1% de BSA à temperatura ambiente, seguido pela lavagem duas vezes em PBS-T. Depois 80 µL de anticorpos Anti-EGFR diluídos em série e anticorpos de controle foram adicionados aos poços e incubados 30 min à temperatura ambiente. Após a incubação do anticorpo, 20 µL do ligante de EGF Biotinilado em uma concentração de 0,5 µg/mL foram adicionados em todos os poços contendo diluições de anticorpo Anti-EGFR ou aos poços contendo apenas PBS-T 1% de BSA e incubados à temperatura ambiente durante 1 hora. Subsequentemente, os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T, seguido pela incubação com 100 µL/poço de reagente secundário Estreptavidina-HRP diluído 1:1000 no tampão de bloqueio e pela incubação à temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T e as placas foram reveladas através da adição de 100

µL/poço de substrato TMB e incubadas durante 60 min. Após a incubação, a reação foi interrompida através da adição de 1 M de H_2SO_4; 100 µL/poço e as placas foram lidas em DO de 450 nm.

Reagentes do ELISA:

1) Tampão de revestimento: 1 x PBS; Gibco cat:20012-019

2) Antígeno: EGFR de comprimento completo do tipo selvagem purificado de células A431; Sigma E2645

3) Placa de ELISA: NUNC Maxisorp; cat: 442404

4) Tampão de bloqueio/diluição: 1% de BSA em PBS-T (PBS-T-1% de BSA)

5) Tampão de lavagem: 1x PBS/0,05% de Tween 20 (PBS-T)

6) Controle positivo: Erbitux, Vectibix

7) Controle negativo: Synagis (Medimmune Inc, Palivizumab, cat. # NDC 60574-4111-1)

8) Ligante de EGF biotinilado; Invitrogen, cat E3477

9) Estreptavidina-HRP, ultrassensível: Sigma S 2438

10) TMB Plus; KemEnTec, cat # 4390L

11) 1 M de H_2SO_4

Os ensaios de ELISA de competição foram empregados para classificar a capacidade dos anticorpos Anti-EGFR de inibir a ligação do ligante de EGF Biotinilado ao receptor EGFR de comprimento completo revestido nos poços de ELISA. Como apresentado na figura 12, tanto Erbitux quanto Vectibix pareciam bloquear de forma muito potente a ligação do ligante de EGF enquanto que o anticorpo de controle negativo Synagis, que não é direcionado contra o EGFR não inibia a ligação do ligante de EGF. Como mostrado na figura 12A, os três anticorpos 992, 1030 e 1042 direcionados contra o domínio III e que reconhecem epitopos não-sobrepostos foram testados isoladamente ou em uma mistura equimolar em relação à sua capacidade de inibir a ligação do ligante de EGF. Dos três anticorpos testados somente o mAb 1030 exibia uma atividade de inibição do ligante de EGF modesta quando comparado ao Erbitux e ao Vectibix. A mistura equimolar dos mAbs 992, 1030 e 1042 parecia ser mais eficiente na inibição da ligação

do ligante de EGF que os anticorpos isolados testados sozinhos. Em uma concentração de IgG total de 1 µg/mL, foi observado que a mistura equimolar inibia a ligação do ligante de EGF aproximadamente duas vezes mais eficientemente que o mAb 1030 e quatro vezes mais eficientemente que os mAbs 992 & 1042 testados isoladamente, mostrando um efeito sinérgico da mistura dos três anticorpos para o domínio III que reconhecem epitopos não-sobrepostos. Como mostrado na figura 12B, os clones Anti-EGFR 1208, 1260, 1277 & 1320 também foram testados neste ensaio. Estes quatro clones eram capazes de inibir a ligação do ligante de EGF de uma maneira dependente da dose que era mais eficiente do que era observado para os clones 992, 1030 e 1042 quando comparados ao controle de Erbitux. Nas concentrações acima de 0,33 µg/mL os clones Anti-EGFR 1208, 1260, 1277 & 1320 pareciam ser tão eficientes no bloqueio da ligação do ligante de EGF que o Erbitux testado nas mesmas concentrações.

Capacidade de inibir a fosforilação do EGFR induzida pelo EGF em células HN5

Os anticorpos anti-EGFR foram testados em relação à reatividade sobre a fosforilação do EGFR em uma análise de western em células. O procedimento de western em células possibilita a detecção do EGFR e do EGFR fosforilado (pEGFR) da mesma amostra, isto por sua vez torna possível comparar a proporção de EGFR em relação à expressão de pEGFR para cada tratamento de anticorpo e conjunto de dados. As células HN5 foram cultivadas de acordo com as instruções fornecidas pela ATCC em DMEM suplementado com 10% de FCS e pen/estrep. 43.000 células HN5 foram semeadas em placas de 96 poços da Nunc (no de cat 167008) 24 h antes da privação de nutrientes. As células foram privadas de nutrientes em DMEM 16 h antes da adição dos anticorpos. Os anticorpos foram adicionados em uma concentração final de 10 µg/mL em 200 µL de DMEM e a mistura foi pipetada para cima e para baixo pelo menos cinco vezes para misturar. Após 30 min de tratamento com anticorpo o EGF foi adicionado em uma concentração de 50 µg/mL nos poços apropriados e mantido durante 7,5 min. Os westerns em células foram realizados essencialmente como as instruções

fornecidas pelo fabricante do kit de western em célula (Odyssey, LI-COR biosciences).

As células foram fixadas em 3,7% de formaldeído (Sigma F-8775, lote 71K500, contendo ~1% de metanol) durante 20 min após o estímulo com EGF. Cinco lavagens de 5 min com PBS-Triton X-100 (0,1%) foram utilizadas para permeabilizar as membranas celulares antes do bloqueio no tampão de bloqueio LI-COR (927-40000). Os anticorpos primários foram adicionados em concentrações correspondentes às das instruções fornecidas e incubados com agitação suave à temperatura ambiente durante 2,5 h (EGFR total de camundongo, diluição de 1:500 biosource international, no de cat AHR5062 e Phospho-EGFR Tyr1173, Coelho diluição de 1:100, biosource, No de cat 44-794G).

Após a incubação com os anticorpos primários as células foram lavadas cinco vezes durante cinco minutos em PBS-T (0,1% de Tween-20) após os quais os anticorpos secundários foram adicionados (anticoelho de cabra IRDye 680, diluição de 1:200, LI-COR no de cat 926-32221 e anticamundongo de cabra, IRDye 800CW diluição de 1:800; LI-COR no de cat 926-32210) e incubados durante 1 h à temperatura ambiente com agitação suave da placa coberta em folha de alumínio.

Antes da medida na leitora de fluorescência Tecan a placa foi lavada cinco vezes durante cinco min em PBS-T. Todas as lavagens foram terminadas através de um movimento de giro interrompido bruscamente das placas, com a parte aberta para baixo, para descartar a solução de lavagem, seguido pelo ato de bater a placa contra toalhas de papel. (Idêntico ao tratamento de placas de ELISA, a coisa importante é a noção de que as células permanecem na placa durante este tratamento e que a solução de lavagem pode ser removida através deste procedimento ao invés de através de sucção, que perturbaria a integridade da monocamada de células). Qualquer solução de lavagem residual deixada da última lavagem foi removida através de sucção suave na lateral dos poços com uma pipeta multicanal. O sinal fluorescente foi medido para o canal de 680 nm (excitação 675 nm e emissão 705 nm, ambas com largura de banda de 10 nm) e para o canal de 800

nm (excitação 762 nm e emissão 798 nm, ambas com largura de banda de 10 nm).

Utilizando a análise de Western em células, se torna evidente que os três anticorpos estão afetando significativamente ($p<0,05$) o status de pEGFR das células HN5; os anticorpos 1208, 1277 e 1320 (Figura 13).

A mistura anti-EGFR (992, 1030 e 1042) de anticorpos Anti-EGFR e os anticorpos individuais contidos na mesma foram testados em relação ao efeito em uma análise de western em células de inibição da fosforilação do EGFR induzida pelo EGF. Como observado na Figura 14, 992 e 1030 e a mistura de anticorpos Anti-EGFR inibiam significativamente a fosforilação do EGFR induzida pelo EGF ($p<0,05$).

Exemplo 5 Internalização de receptores de EGF em células A431NS

As células A431NS (ATCC# CRL-2592) foram tratadas com tripsina partindo de um frasco de cultura T175 80-90% confluente utilizando TrypLE. As células separadas foram lavadas em PBS e suspensas em DMEM sem soro. As células foram divididas em porções de 1-2 mL e incubadas 30 min em gelo com os anticorpos verificados. A concentração de anticorpo era de 10 µg/mL. As células foram lavadas três vezes em DMEM (250 g, 4 min, 4°C) e ressuspensas em 1,8 mL de DMEM. Cada porção foi dividida em seis tubos de FACS cada um contendo 300 µL de suspensão de células. Três tubos de cada porção são colocados em banho de água a 37°C em exatamente 40 min e os outros três são colocados em gelo imediatamente. Após a incubação, as células são lavadas duas vezes a (250 g, 4 min, 4°C) e os péletes são redissolvidos em 100 µL de $F(ab')_2$ de Fcγ anti IgG humana de coelho-FITC em DMEM. As células são incubadas durante 30 min a 4°C antes de serem lavadas três vezes em DMEM a 4°C e analisadas em FACSCalibur.

Os resultados são mostrados na Figura 15. A incubação com Erbitux e Vectibix mostrou um nível equivalente de internalização de receptor em torno de 30% deixando 70% da coloração inicial da superfície. A incubação com 992 sozinho leva a uma regulação para menos do receptor de aproximadamente 45%. A incubação com misturas de anticorpos contendo

dois anticorpos adicionais com epitopos não-sobrepostos leva a um aumento na regulação para menos do receptor: 992 + 1024, 74%; 992 + 1024 + 1030, 83%.

A adição de anticorpos adicionais não levou a um aumento adicional na internalização do receptor. Assim, pelo menos três anticorpos parecem ser necessários para atingir o nível máximo de internalização nas células A431.

EXEMPLO 6 - Ensaios de proliferação

Os danos celulares resultarão inevitavelmente na perda da capacidade da célula de manter e fornecer energia para a função celular metabólica e para o crescimento. Os ensaios de atividade metabólica baseiam-se nesta premissa. Geralmente estes medem a atividade mitocondrial. O Reagente de Proliferação Celular (Cell Proliferation Reagent) WST-1 (Roche Nº de Cat. 11 644 807 001) é um substrato pronto para uso que mede a atividade metabólica de células viáveis. Supõe-se então que a atividade metabólica se correlaciona com o número de células viáveis. Neste exemplo o ensaio de WST-1 foi utilizado para medir o número de células metabolicamente ativas após o tratamento com anticorpos diferentes em concentrações diferentes.

Antes de realizar o ensaio de WST-1, os anticorpos apropriados e as misturas de anticorpos foram diluídos até uma concentração de anticorpo total final de 20 µg/mL em DMEM suplementado com 0,5% de FBS e 1% de P/S fornecendo uma concentração de anticorpo final de 10 µg/mL no poço com a concentração de anticorpo mais alta. 150 µL destas soluções foram então adicionados aos poços na coluna 2 de uma placa de 96 poços e foi feita uma diluição em série de três vezes até a coluna 9 de forma que cada poço contivesse 100 µL de solução de anticorpo. 100 µL do meio foram adicionados na coluna 11. 200 µL do meio foram adicionados nas Fileiras 1 e 8 assim como nas colunas 1 e 12 para diminuir o efeito da evaporação do meio nos poços experimentais.

As células A431-NS são então lavadas com 1xPBS e soltas através do tratamento com tripsina com 3 mL de solução de tripsina. 17 mL de

meio completo são então adicionados e as células são centrifugadas a 300xg (1200 rcf) durante 5 min. O sobrenadante é removido e células são ressuspensas em DMEM + 0,5% de FBS. As células são contadas e sua concentração é ajustada em 15.000 células/mL. 100 µL da suspensão de células (1500 células/poço) são então adicionados aos poços experimentais nas colunas 2-11. As placas são incubadas durante 4 dias em uma incubadora umedecida a 37°C. Então 20 µL do reagente WST-1 são adicionados por poço e as placas são incubadas durante uma hora a 37°C. As placas são então transferidas para um agitador de placas orbital e mantidas durante mais uma hora. A absorbância é medida em 450 e 620 nm (comprimento de onda de referência) em uma leitora de ELISA. A quantidade de células metabolicamente ativas (MAC) é calculada como a percentagem do controle não tratado como a seguir:

$$\%MAC = \left(\frac{(OD\,\text{exp.} - ODmeio)}{(ODnão - tratado - ODmeio)} \right) \times 100$$

Para os estudos de titulação do EGF, o ligante foi diluído até uma concentração de 20 nM/mL em DMEM+0,5% de FBS, fornecendo uma concentração final de 10 nM/mL no poço com a concentração de EGF mais alta. 150 µL desta solução foram então adicionados aos poços na coluna 2 de uma placa de 96 poços e uma diluição em série de três vezes foi feita até a coluna 9 de forma que cada poço contivesse 100 µL de solução de EGF. 100 µL de meio foram adicionados na coluna 11. 200 µL de meio foram adicionados nas Fileiras 1 e 8 assim como nas colunas 1 e 12 para diminuir o efeito da evaporação do meio nos poços experimentais. Os anticorpos apropriados e as misturas de anticorpos foram diluídos até uma concentração de anticorpo total final de 40 µg/mL em DMEM suplementado com 0,5% de FBS e 1% de P/S fornecendo uma concentração de anticorpo final de 10 µg/mL nos poços. 50 µL destas soluções foram então adicionados aos poços nas colunas 2-9 da placa de 96 poços.

As células A431-NS são então lavadas com 1xPBS e soltas através do tratamento com tripsina com 3 mL de solução de tripsina. 17 mL de meio completo são então adicionados e as células são centrifugadas a

300xg (1200 rcf) durante 5 min. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em DMEM + 0,5% de FBS. As células são contadas e sua concentração é ajustada em 40.000 células/mL. 50 µL da suspensão de células (2000 células/poço) são então adicionados aos poços experimentais nas colunas 2-11. As placas são incubadas durante 4 dias em uma incubadora umedecida a 37°C. Então 20 µL do reagente WST-1 são adicionados por poço e as placas são incubadas durante uma hora a 37°C. As placas são então transferidas para um agitador de placas orbital e mantidas durante mais uma hora. A absorbância é medida em 450 e 620 nm (comprimento de onda de referência) em uma leitora de ELISA. As quantidades de células metabolicamente ativas são indicadas pela absorbância em 450 nm subtraída a absorbância no comprimento de onda de referência de 620 nm.

A quantidade de células metabolicamente ativas (MAC) é calculada como a percentagem do controle não tratado como a seguir:

$$\%MAC = \left(\frac{(OD\exp. - ODmeio)}{(ODnão - tratado - ODmeio)} \right) \times 100$$

Resultados

Para mostrar que uma mistura de três anticorpos Anti-EGFR com epitopos não-sobrepostos dentro do domínio III é superior aos anticorpos isoladamente, foi realizado um experimento que investigou a inibição do crescimento de A431-NS. Como pode ser observado na Figura 16A, os anticorpos são fracos inibidores do crescimento de A431-NS por si só, mas quando combinados, é obtido um efeito inibidor sinérgico sobre o crescimento de 431-NS. Embora as misturas de 992 com qualquer um de 1042 ou 1030 sejam também muito potentes, a mistura de todos os três é superior a estas em relação a todas as faixas de concentração de anticorpo.

Os efeitos de anticorpos individuais e misturas de anticorpos sobre o crescimento de células A431-NS estimulado com concentrações variáveis de EGF foram investigados e os resultados são mostrados na Figura 17. Como pode ser observado na Figura 17 concentrações de EGF acima de 0,1 nM na ausência de anticorpos são tóxicas para as células. Entretanto, é evidente que uma mistura de três anticorpos com epitopos não-sobrepostos

dentro do domínio III de EGFR (992, 1030 e 1042) atua de forma sinérgica para inibir o crescimento das células A431-NS na presença de EGF quando testada até pelo menos 0,3 nM de EGF e a mistura é superior a todos os anticorpos monoclonais.

A seguir é demonstrado que o efeito inibidor sinérgico sobre o crescimento de A431-NS também pode ser obtido através da combinação de dois anticorpos com epitopos não-sobrepostos no domínio III de EGFR com anticorpos com epitopos dentro do domínio I ou II de EGFR. Como pode ser observado na Figura 18, combinações dos anticorpos 992 e 1024 que são ambos domínio III de EGFR, com qualquer um anticorpo reativo com o domínio I (1284) ou com o domínio I/II (1434) de EGFR são tão potentes quanto três anticorpos que reagem com epitopos não-sobrepostos dentro do domínio III de EGFR (992+1024+1030). Em adição, estas misturas de anticorpos são mais potentes na inibição do crescimento de A431-NS que os anticorpos anti EGFR terapêuticos Erbitux e Vectibix.

Ensaios similares foram realizados utilizando duas outras linhagens de células cancerosas, DU145 (ATCC#HTB-81) e MDA-MB-468 (ATCC#HTB-132). Os resultados destes ensaios de proliferação são mostrados nas Figuras 16B e 16C. Em ambos os casos, uma mistura de três anticorpos (992, 1030 e 1042) era superior às misturas de dois anticorpos e anticorpos isolados. Nas células DU145, a mistura de três anticorpos era superior ao Vectibix em todas as concentrações e em MDA-MB-468 em concentrações altas.

Utilizando um método similar ao descrito anteriormente, foram testadas combinações diferentes de três anticorpos Anti-EGFR.

Resultados

Os efeitos de combinações diferentes de três anticorpos foram investigados na linhagem de células A431NS. A atividade inibidora do crescimento das vinte mais potentes destas é mostrada na Figura 37. Todas as combinações inibiam a proliferação da linhagem de células A431NS mais de 60% comparada à de um controle não tratado. Uma outra observação interessante é que com a exceção das combinações (992+1024+1254 e

992+1024+1320 e 992+1277+1320) as combinações contêm anticorpos com epitopos não-sobrepostos. Isto mostra que é possível planejar várias combinações de três anticorpos que se ligam a epitopos distintos.

EXEMPLO 7 - apoptose.

A apoptose é um mecanismo biológico que leva à morte da célula. Este mecanismo foi relatado anteriormente através do uso de anticorpos Anti-EGFR, tal como o Erbitux (Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy - focus on cetuximab. Eur J Cancer. 2001 setembro: 37, Suplemento 4:S16-22). Foi, portanto, verificado até qual extensão os anticorpos individuais Anti-EGFR 992, 1042 e 1030 assim como a mistura (992+1042+1030) eram capazes de induzir a apoptose.

$1x10^4$ células A431NS foram incubadas em DMEM suplementado com 0,5% de FBS e antibióticos em determinações triplas em placas de cultura de 96 poços na presença da mistura de EGFR (partes iguais de 992,1030,1042), 992,1030,1042, Erbitux ou Vectibix, em concentrações variando de 0,01 µg/mL até 10 µg/mL. As células e os anticorpos foram incubados durante 22 h. Então os sobrenadantes foram coletados e medidos em um kit de ELISA da Roche, No de Cat: 11774425001 (Basel, Suíça), em relação à presença de complexos de histona-DNA.

O efeito da mistura foi comparado com cada um dos anticorpos monoclonais isolados assim como com os anticorpos de referência Vectibix e Erbitux utilizando células A431NS (resultados na Figura 19). Os anticorpos foram testados na diluição de 10 vezes. A mistura é significativamente ($P<0,05$) mais eficiente comparada com os anticorpos monoclonais individuais assim como o Vectibix quando testada nas concentrações de 1 µg/mL e 10 µg/mL. A mistura aumentou a apoptose de forma estatisticamente significativa ($p<0,05$) comparada com o Erbitux em 1 µg/mL.

EXEMPLO 7b

Em adição ao exemplo 7, a mistura de 992+1024 assim como a mistura de 992+1024+1030 foram investigadas em relação à atividade apoptótica de acordo com o mesmo método que é descrito no exemplo 7 (figura 35). O nível factual de apoptose foi relacionado a um controle positivo máxi-

mo. Ambas as misturas foram comparadas com o Erbitux e com os anticorpos monoclonais individuais 992, 1024 e 1030 assim como com um anticorpo de controle em 1 µg/mL utilizando células A431NS. A mistura de 992+1024 era significativamente melhor que o Erbitux e os anticorpos monoclonais individuais (todos $P<0,05$).

EXEMPLO 8 Eficácia *in vivo*

A mistura anti-EGFR consistindo nos anticorpos 992, 1030 e 1042 foi investigada em relação à eficácia *in vivo* no modelo de xenoenxerto de camundongos nus utilizando células A431NS. Este é um modelo amplamente utilizado para a investigação da potência de anticorpos anticâncer monoclonais, incluindo anticorpos Anti-EGFR. Os camundongos nus são imunocomprometidos e não possuem células T. Isto permite o crescimento de células humanas nos camundongos.

Dois grupos de camundongos nus com 6-8 semanas receberam injeção subcutânea de $1x10^6$ células A431NS. Quando o tamanho médio do tumor atingiu 100 mm^3, o tratamento foi iniciado. Os camundongos receberam cinco injeções de 1 mg de anticorpo, de forma intraperitoneal, com intervalo de 2-3 dias. Os tamanhos dos tumores foram medidos em dois diâmetros utilizando calibres digitais e o volume foi calculado utilizando a fórmula: Volume do tumor (mm^3) = $L \times W^2 \times 0,5$, em que L é o diâmetro mais longo e W é o diâmetro mais curto (Teicher BA, Tumor Models in Cancer Research. Humana Press, NJ, USA 2002, p596). No final do experimento, os tumores foram cortados e pesados.

O Synagis foi utilizado como o anticorpo de controle. O experimento também incluía o tratamento com Erbitux e Vectibix na mesma quantidade utilizando a mesma programação que para a mistura de anti-EGFR (anticorpos 992, 1030 e 1024).

Como observado na figura 20, a mistura de 992, 1030 e 1042 inibia significativamente o crescimento de tumor de A431NS ($P<0,05$). Os pesos médios são mostrados na Figura 21. O resultado se correlacionava com os tamanhos dos tumores medidos. Há uma diferença significativa entre o grupo de tratamento e o grupo de controle.

Exemplo 8b Eficácia *in vivo*

Em adição ao experimento *in vivo* descrito no exemplo 8, as misturas de 992+1024 e 992+1024+1030 foram investigadas no modelo de xenoenxerto de A431NS descrito anteriormente (figura 36). Quatro grupos cada de 9 camundongos nus, com 6-8 semanas, receberam injeção subcutânea de $1x10^6$ células A431NS. Quando o tamanho médio dos tumores atingiu 100 mm^3, os camundongos receberam a primeira injeção de anticorpo. Os três grupos receberam a mistura de 992+1024, 992+1024+1030, Erbitux ou o anticorpo de controle, Synagis. Em todos, os camundongos receberam 17 injeções de 0,5 mg 4 vezes uma semana. A primeira injeção foi fornecida no dia 8 e a última injeção foi fornecida no dia 34. Os tamanhos dos tumores foram medidos durante 56 dias. Após o término do tratamento com anticorpo, os tumores dos camundongos que receberam Erbitux começaram a expandir em relação ao tamanho, enquanto que os tumores continuaram a diminuir em relação ao tamanho nos dois grupos que receberam a mistura de 992+1024 ou 992+1024+1030. Não foi observada expansão no tamanho dos tumores para o grupo de 992+1024 no dia 91 (57 dias após o término do tratamento). O tamanho médio dos tumores para a combinação de 992+1024 era significativamente menor ($P<0,01$) no dia 56 que o tamanho médio dos tumores para os camundongos que receberam Erbitux.

A sobrevivência dos camundongos no experimento também foi monitorada. Os camundongos foram classificados como mortos quando os tumores atingiram os tamanhos máximos permitidos. A tabela a seguir mostra o número de camundongos que sobreviveram 56 dias após a inoculação de células tumorais. Uma maior sobrevivência é observada para ambas as combinações comparadas com o Erbitux.

Grupo	992+1024	992+1024+1030	Erbitux	Ab de Controle
Número inicial de camundongos	9	9	9	9
Camundongos remanescentes no dia 56	9	9	2	0

Experimentos adicionais

Dados preliminares de lisados de tumores provenientes do experimento de xenoenxerto descrito no exemplo 8 mostram que a combinação de 992+1042+1030 induz uma regulação para menos potente da produção de VEGF por A431NS, o primeiro sendo um mediador importante da angiogênese. A maior formação de vasos sanguíneos é um fenômeno observado em muitos tumores sólidos, um mecanismo que participa do suprimento de nutrientes etc., afetando assim as condições de sobrevivência.

Além disso, outros dados preliminares mostram que um nível maior da combinação de anticorpos de 992+1042+1030 pode ser observado nos lisados de tumores provenientes do experimento de xenoenxerto descrito no exemplo 8, quando comparada com Erbitux e Vectibix.

Exemplo 8c. Maior diferenciação de células tumorais *in vivo*

A diferenciação terminal de células é um processo complexo que inclui a ativação de programas de expressão gênica específica ao tipo celular, levando em um processo de várias etapas a uma perda reversível de sua capacidade proliferativa. Na doença maligna, as células cancerosas estão frequentemente em um estado desdiferenciado caracterizado por uma maior taxa de proliferação e foi sugerido que fármacos capazes de induzir a diferenciação terminal de células cancerosas seriam capazes de eliminar as células malignas e restabelecer a homeostase celular normal (Pierce GB, Speers WC: Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. Cancer Res 48:1996-2004, 1988). Sob certas condições experimentais, foi previamente relatado que anticorpos anti-EGFR monoclonais são capazes de aumentar a taxa de diferenciação terminal de células cancerosas escamosas humanas crescidas na forma de tumores de xenoenxerto em camundongos imunocomprometidos (Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z: In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. Clin Cancer Res 6:701-8, 2000; Modjtahedi H, Eccles S, Sandle J, Box G, Titley J, Dean C: Differentiation or immune destruction: two pathways for therapy of squamous cell carcinomas

with antibodies to the epidermal growth factor receptor. Cancer Res 54:1695-701, 1994).

Foi verificada histologicamente a extensão da diferenciação terminal em células A431NS tratadas com anti-EGFR crescidas na forma de xenoenxertos em camundongos. O estudo histológico incluía 3 tumores de xenoenxerto de camundongo selecionados aleatoriamente de cada um dos quatro grupos experimentais descritos no exemplo 8.

Os tecidos foram dissecados e congelados rapidamente, então montados com Tecido-Tek sobre um criomicrótomo (Leitz, modelo 1720), cortados em seções de 5 µm e amostrados em lâminas superfrost plus, então processados para coloração com hematoxilina/eosina. Dois observadores independentes então conduziram a verificação microscópica de todas as seções de tecido de uma maneira cega, classificando as áreas queratinizadas ("pérolas de queratina") como uma medida da extensão da diferenciação terminal (Modjtahedi e outros, 1994). A Tabela 7 lista o resultado obtido. Os camundongos tratados com uma mistura de três anticorpos Anti-EGFR (992+1024+1030, grupo 1) tinham focos notavelmente maiores e mais numerosos de células cancerosas diferenciadas de forma terminal quando comparados com os camundongos tratados com os anticorpos de referência Erbitux e Vectibix (Grupos 2 e 3. respectivamente). Não foi detectada qualquer diferenciação terminal no grupo de controle que recebeu PBS ao invés de anticorpo (grupo 4).

Imagens microscópicas representativas foram obtidas utilizando um microscópio ajustado com uma câmera digital, vide a figura 26.

Em conclusão, uma combinação de três anticorpos Anti-EGFR com epitopos não-sobrepostos dentro do domínio III (clones 992, 1030 e 1042) exibia um efeito indutor de diferenciação maior inesperado sobre as células tumorais *in vivo* quando comparada aos anticorpos monoclonais Erbitux e Vectibix. Os efeitos observados sobre a diferenciação terminal levam à conclusão de que as composições de anticorpos da invenção podem ser utilizadas na terapia de combinação com outros agentes indutores da diferenciação, tais como ácido retinóico, butirato de 4-fenila.

Tabela 7

Grupo	Nº do Tumor	Classificação do Nº de pérolas de queratina	Comentários
1	16	++++	Pérolas de queratina grandes
1	17	+++	Pérolas de queratina grandes
1	54	++++	Pérolas de queratina grandes
2	14	++	Pérolas de queratina pequenas
2	45	++	Pérolas de queratina pequenas
2	49	++	Pérolas de queratina pequenas
3	11	++	Pérolas de queratina pequenas
3	34	++	Pérolas de queratina pequenas
3	56	++	Pérolas de queratina pequenas
4	43	-	
4	60	-	
4	31	-	

Exemplo 8d. Efeito inibidor do crescimento prolongado de uma composição de anticorpos da invenção.

Uma repetição do experimento de xenoenxerto de tumor apresentado nos exemplos 8 e 8b foi realizada para investigar a eficácia *in vivo* da mistura de anticorpos 992+1024. Sucintamente, camundongos BALB/c *nu/nu* receberam injeção subcutânea de 10^6 células A431NS no flanco. Foi permitido que os xenoenxertos de tumor crescessem até um tamanho médio de tumor de 100 mm^3 (dia 7) em cujo ponto os camundongos foram separados aleatoriamente em cinco grupos de nove animais e os tratamentos com anticorpo foram iniciados. Os cinco grupos receberam uma dose alta (2 mg/semana) ou baixa (1 mg/semana) da mistura 992+1024 ou do anticorpo de referência Erbitux ou uma dose alta (2 mg/semana) do anticorpo de controle Synagis. Todos os camundongos receberam um total de 9 injeções de 0,5 ou 1 mg de anticorpo duas vezes por semana começando no dia 7 e terminando no dia 33.

A mistura 992+1024 em dose alta (2 mg/semana) era muito eficiente no controle do crescimento inicial do tumor e na indução da regressão

do tumor em longo prazo quando comparada com o Erbitux (P = 0,0002, figura 38). Nenhum dos animais que receberam 2 mg/semana da mistura 992+1024 foi eliminado no período do estudo (118 dias após o início do experimento, figuras 38 e 39) um resultado significativamente melhor que no grupo de Erbitux de dose alta de 2 mg/semana em que restou apenas um dos nove animais no dia 60 (P = 0,0008, figura 39). Isto mostra o efeito prolongado do tratamento com 992+1024 sobre a sobrevivência em longo prazo. Embora menos eficiente que a dose alta, a dose baixa da mistura 992+1024 (1 mg/semana) também era capaz de controlar o crescimento do tumor e era significativamente melhor comparada com a dose alta de Erbitux de 2 mg/semana quando eram observadas tanto a supressão do tumor (P = 0,0135, figura 38) quanto a sobrevivência (P = 0,0087, Figura 39). Estes resultados demonstram a potência superior da combinação 992+1024 quando comparada com o Erbitux mesmo na dosagem baixa. Os resultados demonstram também a inibição prolongada do crescimento causada pela combinação 992+1024 comparada com um anticorpo monoclonal aprovado.

EXEMPLO 9: Crescimento esferoide

Para o estudo de esferoides, a uma placa de 96 poços de fundo redondo são adicionados 35 µL de 120 mg/mL de solução de Poly-HEMA e deixados até a evaporação durante a noite em um fluxo laminar. O Poly-HEMA previne a adesão das células. As células A431-NS são tratadas como anteriormente, contadas e sua concentração é ajustada em 100.000 células/mL. 50 µL da suspensão de células (5.000 células/poço) são então adicionados aos poços experimentais nas colunas 2-11 junto com 50 µL de uma solução de matrigel a 5%. 200 µL de meio foram adicionados nas Fileiras 1 e 8 assim como nas colunas 1 e 12 para diminuir o efeito da evaporação do meio nos poços experimentais. As placas são centrifugadas a 300xg durante 5 minutos e deixadas para se ordenarem durante a noite em uma incubadora umedecida a 37°C. No dia seguinte os anticorpos apropriados e as misturas de anticorpos foram diluídos até uma concentração de anticorpo total final de 20 µg/mL em uma placa de 96 poços vazia. Isto foi feito em

DMEM suplementado com 0,5% de FBS e 1% de P/S fornecendo uma concentração de anticorpo final de 10 µg/mL no poço com a concentração mais alta de anticorpo. 150 µL destas soluções foram então adicionados aos poços na coluna 2 de uma placa de 96 poços e uma diluição em série de três vezes foi feita até a coluna 9 de forma que cada poço contivesse 100 µL de solução de anticorpo. 100 µL de meio foram adicionados à coluna 11. 100 µL destas soluções são então transferidos para a placa contendo os esferoides e foi deixado que incubasse durante 7 dias. Então 20 µL do reagente WST-1 são adicionados por poço e as placas são incubadas durante uma hora a 37°C. As placas são então transferidas para um agitador de placas orbital e mantidas durante mais uma hora. A absorbância é medida em 450 e 620 nm (comprimento de onda de referência) em uma leitora de ELISA. A quantidade de células metabolicamente ativas (MAC) é calculada como a percentagem do controle não tratado como a seguir:

$$\%MAC = \left(\frac{(OD\exp. - ODmeio)}{(ODnão - tratado - ODmeio)} \right) \times 100$$

Uma mistura de três anticorpos com epitopos não-sobrepostos dentro do domínio III (992+1030+1042) inibe eficientemente o crescimento de esferoides A431-NS e é mais potente que os anticorpos anti-EGFR terapêuticos monoclonais Erbitux e Vectibix (Figura 22).

EXEMPLO 10. Ligação ao ECD do EGFR de cinomólogos

Clonagem do domínio extracelular de EGFR de cinomólogos.

O domínio extracelular de EGFR de cinomólogos excluindo o peptídeo sinal foi clonado partindo do cDNA de cinomólogos isolado da epiderme através da utilização da PCR aninhada e iniciadores específicos à sequência derivados da sequência publicada do EGFR humano de comprimento completo (GENBANK X00588, Ullrich,A. e outros Nature 309(5967), 418-425 (1984)).

Reagentes de PCR:

cDNA de Macaco Cinomólgo isolado da epiderme da pele normal:

CytoMol Unimed, Cat. Nº: ccy34218, Lote Nº: A711054.

Tampão de reação Phusion (5X): Finnzymes, Cat. Nº: F-518, Lote Nº: 11.

Enzima Phusion: Finnzymes, F-530S (2 U/µL).

dNTP 25 mM: Bioline, Cat. Nº: BIO-39029, Lote Nº: DM-103F.

Iniciadores para a amplificação do ECD de EGFR de cinomólogos incluindo a sequência sinal parcial e o domínio transmembrana:

Iniciador 5' ATG: 5'-TCTTCGGGAAGCAGCTATGC-3' (SEQ ID NO: 135)

Iniciador 3' Tm 2: 5'-TTCTCCACTGGGCGTAAGAG-3' (SEQ ID NO: 136)

Iniciadores para a amplificação através da PCR aninhada do ECD de EGFR de cinomólogos pb 1-1863 e incorporação dos sítios de restrição XbaI, MluI e do códon de término antes do domínio transmembrana:

5' EGFR XbaI: 5'-ATCTGCATTCTAGACTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGC-3' (SEQ ID NO: 137)

3' EGFR MluI: 5'-TACTCGATGACGCGTTTAGGATGGGATCTTAGGCCCGTTCC-3' (SEQ ID NO: 138)

Condições da PCR:

30 ciclos: 98°C/30 s de fusão, 55°C/30 s de anelamento, 72°C/60 s de alongamento. Após 30 ciclos foi permitido que os produtos da PCR fossem alongados durante 5 min adicionais.

As reações de PCR foram realizadas com 1 µL de molde e 2 unidades da Enzima Phusion em um volume total de 50 µL de tampão de reação contendo 0,2 mM de dNTP, 0,5 µM de iniciador.

Uma banda de PCR final com um comprimento aparente de aproximadamente 1800 -1900 pb foi obtida e clonada no vetor de expressão. As sequências de DNA e de proteína do domínio extracelular de EGFR de cinomólogos clonado são mostradas na Figura 23 e a sequência de proteína do ECD de EGFR de cinomólogos alinhada com o ECD de EGFR humano é mostrada na Figura 24. O alinhamento das sequências de DNA do ECD de EGFR humano e do ECD de EGFR de cinomólogos exibia 97,6% de identidade de sequência, enquanto que o alinhamento das sequências de proteínas correspondentes exibia 98,6% de identidade de sequência.

Demonstração da reatividade cruzada do anticorpo entre o domínio extracelular de EGFR Humano e de cinomólogos em ELISA.

Para verificar se os anticorpos Anti-EGFR testados se ligavam igualmente bem ao ECD de EGFR tanto Humano quanto de cinomólogos e, consequentemente, permitindo estudos toxicológicos em macacos cinomólogos, diluições em série de quatro vezes de anticorpos partindo de 1 µg/mL foram testadas por ELISA em relação à ligação às proteínas recombinantes do ECD de EGFR Humano e de Cinomólogos. Os anticorpos exibindo perfis de ligação idênticos neste ensaio foram interpretados como uma indicação de boa reatividade cruzada do EGFR das espécies. Os poços de ELISA foram revestidos com 50 µL/poço de EGFR de comprimento completo em uma concentração de 1 µg/mL em PBS durante a noite e 4°C. Na manhã seguinte os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e bloqueados durante uma hora com 100 µL de PBS-T-1% de BSA à temperatura ambiente, seguido pela lavagem duas vezes em PBS-T. A seguir, 50 µL de anticorpos Anti-EGFR diluídos em série e anticorpos de controle foram adicionados aos poços e incubados durante uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação do anticorpo os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T, seguido pela incubação com 50 µL/poço do reagente secundário Estreptavidina-HRP diluído 1:3000 no tampão de bloqueio e pela incubação à temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T e as placas foram reveladas através da adição de 50 µL/poço de substrato TMB e incubadas à temperatura ambiente. Após a incubação a reação foi interrompida através da adição de 1 M de H_2SO_4; 100 µL/poço e as placas foram lidas em DO de 450nm.

Reagentes do ELISA:

1. Placa de ELISA; NUNC Maxisorp; cat: 442404
2. Antígeno: ECD do rEGFR Humano; ECD do rEGFR de cinomólogos
3. Tampão de revestimento: 1 x PBS; Gibco cat:20012-019
4. Tampão de lavagem: 1xPBS/0,05% de Tween 20 (PBS-T)
5. Tampão de bloqueio/diluição: 1% de BSA em PBS-T
6. Conjugado de HRP anti-IgG Humana de Cabra: Serotec, Star 106P

7. TMB Plus (KemEnTec cat # 4390L)
8. (1 M de H_2SO_4)

Como mostrado na figura 25, o ensaio de ELISA descrito podia discriminar entre os anticorpos para anti-ECD do EGFR Humano e de cinomólogos com ligação cruzada (Figura 25 A) e os anticorpos específicos à espécie reconhecendo apenas o ECD de EGFR Humano utilizado para as imunizações de camundongos (Figura 25B).

EXEMPLO 11. Inibição da motilidade

A maior parte das mortes causadas por câncer é derivada da disseminação de células tumorais e do crescimento subsequente em localizações distantes. A invasão local do tecido normal adjacente compromete as funções homeostáticas e impede a remoção cirúrgica ou radiológica do tumor. Investigações recentes evidenciaram a função central que a motilidade induzida desempenha na promoção deste espalhamento. É sabido que o EGFR facilita a motilidade e o espalhamento celular e, portanto, a inibição da motilidade mediada pelo EGFR é um mecanismo importante de fármacos direcionados para o EGFR.

O efeito de uma mistura dos dois anticorpos 992 e 1024 sobre a motilidade das linhagens de células de carcinoma de cabeça e pescoço foi investigado. Os esferoides consistindo em 10.000 células foram preparados durante a noite como descrito no exemplo 9. Os esferoides foram então transferidos para frascos de cultura de células NUNC T25 e a adesão foi permitida durante a noite. 10 µg/mL da mistura de anticorpos 992+1024 ou de um anticorpo de controle negativo foram então adicionados e os esferoides foram incubados durante mais 24 horas. Foram otidas imagens no aumento de 40x e a área coberta pelas células foi medida utilizando o software Image J.

Resultados: Como pode ser observado na Figura 27A a adição dos anticorpos 992 e 1024 específicos ao EGFR leva a um decréscimo significativo na área coberta pelas células tumorais. A motilidade é quantificada na Figura 27B, que mostra que a motilidade é diminuída aproximadamente 60% quando comparada com o anticorpo de controle negativo. Este decrés-

cimo na motilidade é altamente significativo $p<0,01$.

Assim, uma combinação dos anticorpos 992 e 1024 inibe potencialmente a motilidade das células tumorais mediada por EGFR, o que indica que as combinações de anticorpos anti EGFR poderiam ser utilizadas para o tratamento da doença disseminada.

Exemplo 12. Regulação para mais da Involucrina pela composição de anticorpo Sym004

A Involucrina é um marcador da diferenciação precoce de células escamosas e uma proteína que está envolvida na formação do envelope cornificado. Os níveis de involucrina podem, portanto, ser utilizados como uma medida do número de células tumorais que se diferenciaram. Os níveis de Involucrina foram estimados nos lisados de proteínas de tumores de xenoenxerto de A431NS não tratados ou tratados com Erbitux, Vectibix ou uma mistura dos anticorpos 992+1030+1042 utilizando um kit de ELISA para Involucrina disponível comercialmente (Biomedical Technologies). Os lisados de tumor foram preparadas através da homogeneização de 30-40 mg de tecidos tumorais em 1 mL de tampão RIPA utilizando o TissueLyzer da Qiagen. A concentração de proteína em cada lisado clarificado foi determinada utilizando o kit de ensaio da proteína BCA da Pierce e o nível de involucrina foi estimado utilizando o ensaio de ELISA em 0,4 µg de proteína de cada amostra.

Resultados: Como pode ser observado na Figura 27 a Involucrina é encontrada em níveis significativamente maiores no grupo de tratamento com 992+1030+1042 quando comparados aos dos grupos de tratamento com o controle negativo e com Erbitux ou Vectibix. Assim, uma combinação dos anticorpos 992, 1030 e 1042 aumenta os níveis de involucrina nos tumores de xenoenxerto de A431NS e, portanto, induz presumidamente um grau maior de diferenciação de A431NS. Um resultado que se correlaciona bem com o alto número de pérolas de queratina encontrado neste grupo de tratamento particular (vide exemplo 8).

Exemplo 13 Internalização do EGFR pela composição de anticorpo Sym004

Alguns anticorpos funcionam através da indução da internaliza-

ção de seu alvo de superfície. É sabido que o EGFR sofre internalização quando ativado por ligante tal como EGF.

A capacidade de uma mistura dos dois anticorpos 992 e 1024 de induzir a internalização do EGFR foi investigada utilizando microscopia confocal. As células A431NS e HN5 foram semeadas em lâminas com câmaras de 8 poços da LabTek e incubadas durante a noite em DMEM contendo 0,5% de FBS. Foram então adicionados às células 10 µg/mL da mistura de anticorpos de 992+1024 marcada com Alexa-488 ou do anticorpo de controle Erbitux e então incubados durante períodos de tempo diferentes. Foram obtidas imagens em um aumento de 60x utilizando um microscópio confocal da Biorad com um orifício grande ou um orifício pequeno.

Resultados: Como mostrado na Figura 29A a adição dos anticorpos 992 e 1024 específicos ao EGFR marcados com Alexa-488 durante 2 horas leva ao acúmulo dos anticorpos nas vesículas intracelulares em ambas as linhagens de células A431NS e HN5. O Erbitux, em contraste, é principalmente encontrado na superfície celular. A Figura 29B mostra imagens de células A431NS utilizando um orifício menor, que resulta em imagens de seções mais finas das células. É evidente partindo destas imagens que os anticorpos 992+1024 estão localizados dentro das células enquanto que o Erbitux é principalmente encontrado na superfície celular. A Figura 30 mostra um período de tempo da internalização mediada por 992+1024 e tão logo quanto 30 minutos após a adição de anticorpos estes podem ser encontrados nas vesículas intracelulares. Após 4 horas quase todos os anticorpos 992+1024 são encontrados dentro das células com coloração na superfície baixa ou muito fraca. O Erbitux, em contraste, permanece na superfície celular. Também foi obtida uma evidência que mostra que a internalização induzida por 992+1024 leva a uma degradação prolongada e à remoção do EGFR nas células.

Assim, uma combinação dos anticorpos 992 e 1024 rapidamente e potencialmente induz a internalização do EGFR enquanto que o Erbitux não.

Exemplo 14 Medida das afinidades dos anticorpos com ressonância de plasmônio de superfície.

Medida das afinidades monovalentes dos anticorpos IgG Sym004 contra o ECD do EGFR solúvel recombinante.

A análise cinética dos anticorpos IgG de comprimento completo da invenção foi realizada em um BIAcore 2000, empregando um ensaio que é descrito em (Canziani, Klakamp e outros 2004, Anal. Biochem, 325:301-307) que permite a medida das afinidades monovalentes de moléculas de IgG inteiras contra um antígeno solúvel. Sucintamente, aproximadamente 10.000 Ru de um anticorpo Fc anti-IgG humana policlonal foram conjugadas à superfície de um chip CM5 de acordo com as instruções do fabricante, seguido pela captura de 25 µg de anticorpos Anti-EGFR individuais da invenção ou do controle negativo Synagis na superfície do anti-Fc Chip. A densidade da IgG capturada foi otimizada para cada clone, de forma que a ligação da concentração mais alta do antígeno empregado no ensaio não excedesse 25 Ru. Depois 250 µL de ECD de EGFR humano solúvel, que foi mostrado previamente que continha somente proteína monovalente através de cromatografia por exclusão em gel, foram injetados a uma vazão de 25 µL/min em diluições em série de duas vezes em tampão HBS-EP para gerar curvas de resposta. A superfície do chip foi regenerada entre ciclos através da extração dos complexos de anticorpo/antígeno capturados com uma injeção de 10 segundos de 100 mM de H_3PO_4. A análise cinética foi realizada primeiro subtraindo a resposta da célula de fluxo contendo o anticorpo de controle negativo Synagis seguida pela subtração da resposta gerada pela injeção de tampão HBS-EP sozinho ("referência dupla"). A constante da taxa de associação (ka) e a constante de dissociação (kd) foram avaliadas de forma global partindo dos sensogramas gerados com o software 4.1 de avaliação BIA fornecido pelo fabricante.

Reagentes:

1. Chip CM5: Biacore, Nº de Cat. BR-1000-14
2. NHS: Biacore BR-1000-50
3. EDC: Biacore BR-1000-50

4. 10 mM de Tampão acetato pH 4,5: Biacore, Nº de Cat. BR-1003-50
5. Fc anti-IgG Humana de Cabra: Caltag, Nº de Cat. H10500
6. Etanolamina, 1,0 M pH 8,5: Biacore BR-1000-50
7. 10 x tampão de corrida HBS-EP: 0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% v/v de Tensoativo P20
8. Antígeno: Domínio extracelular do EGFR Humano com 6xHis.
9. 100 mM de H_3PO_4

As afinidades monovalentes calculadas das IgGs de comprimento completo da invenção contra o ECD de EGFR Humano solúvel são mostradas na Tabela 8 a seguir.

Afinidades medidas dos anticorpos IgG anti-EGFR contra o receptor solúvel. As medidas dos anticorpos foram realizadas através da Ressonância de Plasmônio de Superfície em um BIAcore 2000 empregando o software de avaliação fornecido pelo fabricante. * A afinidade de 992 foi determinada através da Análise de Scatchard.

Tabela 8

IgG	k_{ON} (M^{-1} s^{-1})	koff (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	K_D (nM)
992*	N.A.	N.A.	0,2	170,0
1024	1,8E+05	4,9E-03	2,4	26,7
1030	1,3E+04	3,7E-04	31,1	29,2
1254	8,5E+04	1,0E-03	11,3	12,7
1260	3,7E+04	1,6E-04	74,1	4,2
1261	1,7E+05	3,2E-03	3,6	18,6
1277	1,3E+05	5,3E-05	217,6	0,4
1284	3,2E+04	1,5E-04	78,1	4,6
1320	1,2E+05	2,8E-03	4,1	24,2
1347	2,4E+04	5,0E-04	22,9	21,4

N.A.: Não aplicável.

Os anticorpos Sym004 mais testados reconheciam o ECD de EGFR humano solúvel com afinidades na faixa de 10 - 20 nM, exceto 1260, 1277 e 1284 que tinham afinidades mais altas de 4,2 nM, 0,4 nM e 4,6 nM

respectivamente. Finalmente foi observado que 992 se liga ao ECD de EGFR solúvel com uma afinidade muito menor que os outros anticorpos testados. Consequentemente, a análise cinética deste anticorpo tinha que ser determinada através da análise de Scatchard que revelou uma afinidade de 170 nM contra o ECD de EGFR humano solúvel.

Medida das afinidades de anticorpos Fab Sym004 contra o ECD de EGFR recombinante imobilizado.

Para verificar diferenças possíveis na apresentação de antígenos entre o ECD de EGFR apresentado na forma solúvel e imobilizada, foi realizada uma nova medida de afinidade em um antígeno do Receptor EGFR quimérico imobilizado chamado de EGFR-Fc (R&D Systems, 344-ER), consistindo no ECD de EGFR Humano fundido ao Fc de IgG Humana. Para esta finalidade, foram gerados fragmentos Fab dos anticorpos IgG 992, 1024 & 1030 para permitir a medida das afinidades monovalentes.

Produção de Fab:

Os fragmentos Fab de 992, 1024 e 1030 foram produzidos através da digestão com Papaína utilizando um Kit de preparação de Fab da Pierce e seguindo as instruções do fabricante. Sucintamente 2 mg de cada anticorpo IgG sofreram troca de tampão em colunas NAP-5 (Amersham Biosciences) pelo tampão de digestão recém-preparado contendo 20 mM de Cisteína-HCl, pH 7,0 seguindo as instruções do fabricante. Então uma suspensão de 350 µL de esferas de Papaína foi lavada duas vezes no mesmo tampão de digestão antes das esferas serem centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Os anticorpos foram digeridos através da adição de 1 mL de anticorpo IgG que sofreu troca de tampão às esferas e de incubação durante a noite a 37°C com agitação a 1000 rpm. Na manhã seguinte, a IgG não digerida foi separada do Fab bruto através da eliminação de IgG de comprimento completo em colunas HiTrap Protein A (Ge Healthcare). O Fab produzido foi finalmente submetido à diálise contra PBS durante a noite e analisado com SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras. Uma banda de proteína de aproximadamente 50 kDa sob as condições não redutoras foi interpretada como uma indicação da produção bem-sucedida

de Fab.

Reagentes:

1. Kit de preparação de Fab ImmunoPure; Pierce; Nº de Cat. 44885
2. Coluna de dessalinização NAP5; Amersham, Nº de Cat. 17-0853-02
3. PBS pH 7,2; Gibco; #20012-019
4. HiTrap Protein A HP, coluna de 1 mL; GE Healthcare; #17-0402-01
5. NuPAGE 4-12% Novex Bis-Tris Gel; Invitrogen; #NP0322BOX
6. Marcador molecular; Seeblue Plus 2; Invitrogen; # LC5925
7. Anticorpos anti-EGFR - 2,0 mg de cada.

A análise cinética dos anticorpos Fab da invenção foi realizada em um Biacore 2000, utilizando antígeno recombinante imobilizado sobre a superfície do sensor a uma densidade muito baixa para evitar limitações no transporte de massa. Sucintamente, um total de 285 Ru de quimera ECD de EGFR-Fc recombinante (R&D Systems, Nº de Cat. 344-ER) foi conjugado com a superfície de um chip CM5 de acordo com as instruções do fabricante. Então os fragmentos Fab derivados dos anticorpos da invenção foram testados em diluições em série de duas vezes, partindo de uma concentração otimizada que não resultava em valores máximos de Ru acima de 25 quando testados sobre o chip com EGFR imobilizado. A análise cinética foi realizada primeiro subtraindo a resposta gerada pela injeção do tampão HBS-EP sozinho. A constante da taxa de associação (kA) e a constante de dissociação (kd) foram avaliadas de forma global partindo dos sensogramas gerados com o software 4.1 de avaliação BIA fornecido pelo fabricante.

As afinidades calculadas dos fragmentos Fab testados da invenção contra o ECD de EGFR Humano imobilizado são mostradas na Tabela 9 a seguir.

Afinidades medidas de anticorpos Fab anti-EGFR contra o receptor imobilizado. As medidas do anticorpo foram realizadas através da Ressonância de Plasmônio de Superfície em um BIAcore 2000 empregando o software de avaliação fornecido pelo fabricante. * A afinidade de 992 foi determinada através da Análise de Scatchard.

Tabela 9

Fab	k_{ON} (M^{-1} s^{-1})	koff (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	K_D (nM)
Fab 992*	N.A.	N.A.	0,2	150,0
Fab 1024	1,9E+05	4,9E-03	2,3	25,6
Fab 1030	8,7E-04	2,0E-04	57,5	2,3

N.A.: Não aplicável.

Como apresentado na Tabela 9 acima, foi observado que os fragmentos Fab de 992 e 1024 possuem afinidades de 150 nM e 26 nM respectivamente em concordância com as afinidades apresentadas no exemplo anterior, ilustrando diferenças sem significância no reconhecimento do anticorpo contra o EGFR solúvel e imobilizado para estes dois anticorpos. Entretanto, o anticorpo 1030 exibia uma afinidade dez vezes maior de 2,3 nM contra o antígeno imobilizado quando comparada à do receptor solúvel e, consequentemente, reconhecia preferencialmente um epitopo exposto no antígeno imobilizado.

EXEMPLO 15: Investigação da apresentação do antígeno EGFR e classificação das afinidades funcionais nas células A431-NS.

Comparação entre a apresentação de antígenos nas células A431-NS e o receptor EGFR purificado de comprimento completo.

Uma vez que a análise cinética revelou que o anticorpo 992 reconhecia o ECD de EGFR recombinante com uma afinidade entre 150 - 170 nM, foi verificado se esta afinidade fraca era devido ao fato de que o mAb 992 se ligava preferencialmente às conformações nativas de EGFR que são expressas nas células A431-NS ao contrário das conformações apresentadas no ECD de EGFR recombinante ou no EGFR de comprimento completo purificado de células A431. Para verificar as diferenças nas preparações de antígeno do receptor de EGF, estudos de ligação de ELISA concorrentes de

uma subpopulação dos anticorpos da invenção foram realizados com fragmentos Fab para evitar os efeitos de avidez sobre as células A431-NS testadas e EGFR de comprimento completo purificado das mesmas células.

Produção de Fab: A produção de fragmentos Fab foi realizada como descrito no exemplo 14.

ELISA Indireto: Para o ELISA indireto, o EGFR de comprimento completo (Sigma E2645) foi revestido a 1 µg/mL em tampão Carbonato (50 µL/poço) durante a noite a 4°C. Na manhã seguinte, os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e bloqueados durante uma hora com PBS-T contendo 1% de BSA à temperatura ambiente seguido pela lavagem duas vezes em PBS-T. A seguir, diluições em série de 50 µL de anticorpos Fab em DMEM contendo 1% de BSA foram adicionados em poços de ELISA independentes e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente, após a qual os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T. A seguir, 50 µL de um conjugado de HRP anti-Humano de Cabra (específico ao Fab) secundário diluído 1:5000 em DMEM contendo 1% de BSA foram adicionados e incubados em gelo durante 30 min. Finalmente, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T e as placas foram reveladas através da adição de 50 µL/poço de substrato TMB e lidas em 620 nm a cada 5-15-30 min. Após a incubação com o substrato, a reação foi interrompida através da adição de 1 M de H_2SO_4 e absorbância foi lida em 450 nm.

Reagentes, ELISA indireto:

1) Tampão de revestimento: 50 mM de tampão Carbonato, pH 9,8
2) Antígenos: EGFR de comprimento completo do tipo selvagem purificado de células A431; Sigma E2645
3) Placa de ELISA: NUNC Maxisorp; Cat. Nº: 442404
4) Tampão de lavagem: 1x PBS/0,05% de Tween 20 (PBS-T)
5) Tampão de bloqueio/diluição: 1% de BSA em PBS-T (PBS-T-1% de BSA)
6) Tampão de diluição do anticorpo: DMEM contendo 1% de BSA
7) Conjugado de HRP anti-Humano de Cabra (específico ao Fab): Jackson, Nº de Cat. 109-035-097

8) Substrato TMB Plus: KemEnTec, Nº de Cat. 4390L

9) 1 M de H_2SO_4

ELISA de células: As afinidades de ligação relativas definidas como a concentração molar que fornece a metade da DO máxima (ED50) foram determinadas através de titulações do anticorpo em células A431-NS. Sucintamente, 10.000 células A431-NS foram crescidas em placas de ELISA de 96 poços contendo DMEM com adição de 0,5% de FCS e 1% de P/S a 37°C, 5% de CO_2 durante a noite. Na manhã seguinte, as células confluentes (aproximadamente 20.000/Poço) foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas através da incubação com uma solução de paraformaldeído a 1% durante 15 min à temperatura ambiente seguida pela lavagem quatro vezes com PBS. A seguir, os anticorpos para EGFR testados e o anticorpo de controle negativo Synagis foram diluídos em série em DMEM contendo 1% de BSA e 50 µL de cada diluição adicionada nos poços e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente, após a qual os poços foram lavados quatro vezes com PBS. Então 50 µL de um conjugado de HRP anti-Humano de Cabra (específico ao Fab) diluído 1:5000 em DMEM contendo 1% de BSA foram adicionados e incubados em gelo durante 30 min. Finalmente os poços foram lavados quatro vezes com PBS e as placas foram reveladas através da adição de 50 µL/poço de substrato TMB Plus e lidas em 620 nm a cada 5-15-30 min. Após a incubação com o substrato a reação foi interrompida através da adição de 1 M de H_2SO_4 e absorbância foi lida em 450 nm. A afinidade funcional expressa na forma de valores de ED50 foi calculada através da subtração da ligação residual média somente com o reagente secundário, seguida pela normalização de curvas de ligação através da representação gráfica da % de ligação máxima em relação a cada anticorpo testado.

<u>Reagentes, ELISA de células</u>:

1) Meio DMEM: Gibco, Cat. Nº 41966-029

2) FCS: Gibco, Nº de Cat. 10099-141

3) Pen strep (P/S): Gibco, Nº de Cat. 15140-122

4) Placa de ELISA: Costar, Nº de Cat. 3595

5) Tampão de lavagem (PBS): Gibco cat. 20012-019
6) Tampão de diluição de anticorpo: DMEM contendo 1% de BSA
7) Solução de fixação de células: BD Biosciences, Nº de Cat. 340181
8) Conjugado de HRP anti-Humano de Cabra (específico ao Fab): Jackson, Nº de Cat. 109-035-097
9) Substrato TMB Plus: KemEnTec, Nº de Cat. 4390L
10) 1 M de H_2SO_4

As diferenças na apresentação de antígeno no receptor de EGF expresso em células A431-NS e no receptor purificado das mesmas células foram determinadas com estudos de ligação em ELISA concorrente, empregando o mesmo reagente de anticorpo secundário e períodos de tempo de incubação. Os resultados são mostrados na Figura 31. O experimento mostrou claramente que os anticorpos Fab 992 e 1024 se ligavam fracamente ao EGFR de comprimento completo purificado revestido nos poços de ELISA quando comparados à ligação das mesmas concentrações de Fab 1030. Entretanto, esta atividade de ligação fraca de 992 e 1024 foi restaurada quando os anticorpos foram testados em células A431-NS contra as quais todos os três Fabs exibiam atividade de ligação forte. A comparação dos dois ELISAs diferentes ilustrava claramente uma preferência dos Fabs 992 e 1024 pela ligação às conformações de EGFR nativas que são expressas nas superfícies celulares ao contrário das conformações apresentadas no antígeno purificado nos poços de ELISA. O resultado também sugeria que a afinidade fraca aparente de 992 medida com ressonância de plasmônio de superfície no ECD de EGFR solúvel ou imobilizado recombinante era divida à apresentação desfavorável do epitopo do anticorpo 992 nos sistemas testados.

<u>Classificação das afinidades funcionais nas células A431-NS.</u>

Os ELISAs de células realizados como descrito anteriormente foram utilizados para classificar as afinidades funcionais de IgG e fragmentos Fab de 992, 1024, 1030, Vectibix e Erbitux através do cálculo dos valores de metade da DO máxima expressos na forma de valores de ED50. O resultado desta análise é mostrado na Fig. 32 e os valores de ED50 calculados

são apresentados na Tabela 10 a seguir.

Tabela 10: Classificação das afinidades funcionais expressas na forma de valores de ED50 com base nos efeitos de avidez de IgG ou da afinidade monovalente de Fab. Os valores de ED50 foram determinados através das titulações em série do anticorpo nas células A431-NS. SD: Desvio padrão do ajuste da curva.

Avidez de IgG

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
992	- 0,56	0,3	0,04
1024	- 0,49	0,3	0,05
1030	0,17	1,5	0,02
Vectibix	- 0,15	0,7	0,04
Erbitux	- 0,23	0,6	0,04

Afinidade de Fab

Fab	Log ED50	ED50 nM	SD
992	1,00	9,9	0,11
1024	0,30	2,0	0,02
1030	0,27	1,8	0,05
Vectibix	0,08	1,2	0,04
Erbitux	- 0,07	0,8	0,06

O experimento mostrava claramente que quando os efeitos de avidez eram levados em consideração, as IgG 992 e 1024 pareciam estar ligadas às células A431-NS com avidez maior que tanto Erbitux quanto Vectibix, embora a IgG 1030 tivesse a afinidade mais baixa dos anticorpos IgG testados. Entretanto, quando a afinidade monovalente nas células foi determinada utilizando fragmentos Fab, 992 tinha a afinidade mais baixa de aproximadamente 10 nM. Todavia, esta afinidade monovalente funcional era ainda pelo menos 15 vezes menor que a testada com BIAcore.

EXEMPLO 16: Investigação do aumento da ligação induzido por anticorpo.

O experimento de competição BIAcore realizado em pares de anticorpos da invenção revelou que a ligação de 992 e 1024 era aumentada aproximadamente 55% e 58% respectivamente (Figura 9A), quando estes anticorpos eram testados contra cada outro em ambas as direções. Para investigar adicionalmente este fenômeno, foi planejado um ELISA de células utilizando células não fixadas para verificar o efeito da ligação de IgG de um clone de anticorpo após a saturação prévia do receptor com o fragmento Fab de um anticorpo que se liga a um epitopo não-sobreposto.

ELISA de células: O ELISA foi realizado essencialmente como descrito no exemplo 15 com modificações. As células foram mantidas não fixadas para permitir a flexibilidade conformacional do EGFR após as adi-

ções de anticorpo. Sucintamente, 10.000 células A431-NS foram crescidas em placas de ELISA de 96 poços contendo DMEM com adição de 0,5% de FCS e 1% de P/S a 37°C, 5% de CO_2 durante a noite. Na manhã seguinte, as células confluentes (aproximadamente 20.000/Poço) foram lavadas duas vezes com PBS e os poços para investigação dos aumentos da ligação induzidos por anticorpo foram pré-incubados com 25 µL de 40 nM de fragmentos Fab isolados de qualquer um de 992, 1024 ou 1030 ou 12,5 µL de 80 nM de cada Fab isolado em combinações duplas previamente mostradas que forneciam ligação saturada. 25 µL de DMEM contendo 1% de BSA foram adicionados aos poços utilizados para o teste dos anticorpos IgG sem fragmentos Fab adicionados. Após a adição de Fab e meio, os poços de ELISA foram incubados durante 30 min à temperatura ambiente, após os quais 25 µL de diluições em série de três vezes de IgGs da invenção ou do controle negativo Synagis, partindo de uma concentração de 360 nM foram adicionados aos poços e incubados em gelo durante uma hora. A seguir, os poços foram lavados quatro vezes com PBS e 50 µL de um conjugado de HRP anti-Humano de camundongo (específico ao Fc) monoclonal secundário diluído 1:5000 em DMEM contendo 1% de BSA foram adicionados e incubados em gelo durante 30 min. Finalmente os poços foram lavados quatro vezes com PBS e as placas foram reveladas através da adição de 50 µL/poço do substrato TMB e lidas em 620 nm a cada 5-15-30 min. Após a incubação com o substrato a reação foi interrompida através da adição de 1 M de H_2SO_4 e a absorbância foi lida em 450 nm. A afinidade funcional expressa na forma de valores de ED50 foi calculada através da subtração da ligação residual média com o reagente secundário sozinho, seguida pela normalização de curvas de ligação através da representação gráfica da % de ligação máxima em relação a cada anticorpo testado.

Reagentes, ELISA de células:

1) Meio DMEM: Gibco, Cat. Nº 41966-029
2) FCS: Gibco, Nº de Cat. 10099-141
3) Pen strep (P/S): Gibco, Nº de Cat. 15140-122
4) Placa de ELISA: Costar, Nº de Cat. 3595

5) Tampão de lavagem (PBS): Gibco cat. 20012-019
6) Tampão de diluição de anticorpo: DMEM contendo 1% de BSA
7) Conjugado de HRP anti-Humano de Camundongo (específico ao Fc): Ab-direct, Nº de Cat. MCA647P
8) Substrato TMB Plus: KemEnTec, Nº de Cat. 4390L
9) 1 M de H_2SO_4

As investigaçãos dos aumentos da ligação induzidos por anticorpo foram determinadas através de estudos de ligação em ELISA concorrente, empregando o mesmo reagente de anticorpo secundário e períodos de tempo de incubação. O resultado do estudo é mostrado na Figura 33 e os valores de ED50 calculados na Tabela 11 a seguir.

Tabela 11: Classificação das afinidades funcionais expressas na forma de valores de ED50 com base nos efeitos de avidez de IgG com ou sem a saturação prévia do receptor com os fragmentos Fab listados. Os valores de ED50 foram determinados através de titulações em série do anticorpo IgG em células A431-NS. SD: Desvio padrão do ajuste da curva.

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
IgG 992	- 0,24	0,6	0,07
IgG 992 / Fab 1024	- 0,31	0,5	0,02
IgG 992 / Fab 1030	- 0,38	0,4	0,05
IgG 992 / Fab 992 e 1030	- 0,34	0,5	0,04

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
IgG 1024	- 0,01	1,0	0,01
IgG 1024 / Fab 992	- 0,05	0,9	0,04
IgG 1024 / Fab 992 e 1030	- 0,08	0,8	0,02

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
IgG 1030	0,33	2,2	0,06
IgG 1030 / Fab 992	0,20	1,6	0,03
IgG 1030 / Fab 992 e 1024	0,34	2,2	0,06

Como apresentado na figura 33 e na Tabela 11 acima, a IgG 992 exibia um aumento evidente de ligação após a saturação prévia do receptor com fragmentos Fab de qualquer um de 1024 ou 1030 ou 1024 junto

com 1030. A incubação com fragmentos Fab resultou em valores de ED50 menores de 0,5; 0,4 & 0,5 nM respectivamente comparados com 0,6 nM quando a IgG 992 foi testada sozinha. Similarmente as IgGs 1024 e 1030 também exibiram maior ligação quando as células foram primeiramente saturadas com Fab 992 e apenas 1024 quando ambos os Fabs 992 e 1030 foram adicionados às células antes da IgG. Este resultado ilustrava claramente o benefício de ter mais de um anticorpo contra epitopos não-sobrepostos no mesmo receptor-alvo.

Afinidades funcionais ligeiramente menores foram determinadas neste experimento quando comparadas às do exemplo 2. Este resultado é provavelmente devido ao fato de que um reagente secundário diferente foi utilizado no presente exemplo e devido ao fato de que as IgGs testadas foram incubadas com células não fixadas em gelo para evitar a internalização.

Exemplo 16B. *Clonagem de EGFR de comprimento completo de cinomólogos.*

O EGFR de cinomólogos de comprimento completo incluindo o peptídeo sinal foi clonado partindo do cDNA de cinomólogos isolado da epiderme através da utilização da PCR aninhada e de iniciadores específicos à sequência derivados da sequência publicada do EGFR humano de comprimento completo (GENBANK X00588, Ullrich, A. e outros Nature 309(5967), 418-425 (1984)).

Reagentes de PCR:

cDNA de Macaco Cinomólgo isolado da epiderme da pele normal:

CytoMol Unimed, Cat. Nº: ccy34218, Lote Nº: A711054.

Tampão de reação FastStart (10X): Roche, Cat. Nº: 03 553 361 001

Enzima FastStart: Roche, Roche, Cat. Nº: 03 553 361 001

Enzima Phusion: Finnzymes, F-530S (2 U/µL).

dNTP 25 mM: Bioline, Cat. Nº: BIO-39029

Iniciadores para a amplificação de EGFR de cinomólogos de comprimento completo incluindo a sequência sinal:

Iniciador 5' ATG: 5'-TCTTCGGGAAGCAGCTATGC-3' (SEQ ID NO: 135)

Iniciador 3' STOP: 5'- TCATGCTCCAATAAATTCACTG -3' (SEQ ID NO: 139)

Condições da PCR:

95°C/2 min, 40 ciclos: 95°C/30 s, 55°C/30 s, 72°C/3 min 30 s com uma incubação final a 72°C durante 5 min.

Iniciadores para a PCR aninhada que amplificam o EGFR de cinomólogos de comprimento completo e que incorporam os sítios de restrição Not e Xho:

E579 Cyn Not5' 5' – GGAGTCGGCGGCCGCACCATGCGACC CTCCGGGACGG-3 (SEQ ID NO: 140)

E580 Cyn Xho5' 5' – GCATGTGACTCGAGTCATGCTCCAATAA ATTCACTGC-3 (SEQ ID NO: 141)

Condições da PCR:

95°C/ 2 min, então 30 ciclos: 95°C/30 s de fusão, 55°C/30 s de anelamento, 72°C/3 min de alongamento. Após 30 ciclos, foi permitido que os produtos da PCR sofressem alongamento durante 10 min adicionais.

As reações da PCR foram realizadas com 0,5 µL de molde e 0,1 µL de Enzima Phusion, 0,4 µL de enzima FastStart em um volume total de 50 µL de tampão de reação com uma concentração final de 1x tampão FastStart, 0,2 mM de dNTP e 0,2 µM de cada iniciador.

Um fragmento de PCR com um comprimento aparente de aproximadamente 4000 pb foi obtido e clonado utilizando o kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen, Part Nº 4506-41) e sequenciado. As sequências de DNA e de proteína do EGFR de cinomólogos clonado são mostradas na Figura 34. Um alinhamento das sequências de proteínas de EGFR humano e de EGFR de cinomólogos exibia 99,2% de identidade de sequência.

Demonstração da reatividade cruzada do anticorpo entre EGFR Humano e de cinomólogos de comprimento completo através da análise de FACS.

Os EGFRs Humano e de cinomólogos de comprimento completo foram expressos na superfície de células CHO através de transfecção estável e as células foram testadas em relação à ligação a um conjunto de anticorpos diluídos em série para EGFR através da análise de FACS. As de-

terminações foram feitas sob condições dependentes de K_D, mantendo um excesso molar de anticorpo que era pelo menos 5 vezes maior que o número de moléculas de antígeno do EGFR expressas na superfície celular de um número fixo de células em todas as séries de diluição de anticorpo. Esta configuração permitiu a análise de FACS do anticorpo que se liga na saturação completa do receptor para todas as concentrações de anticorpo testadas.

Sucintamente a análise de FACS quantitativa foi realizada em um BD FACS array Bioanalyzer System para determinar o número de moléculas de EGFR expressas na superfície de células CHO transfectadas com qualquer um de EGFR Humano ou de cinomólogos de comprimento completo. A análise foi realizada através da titulação da IgG de Erbitux marcado com PE nas células e para determinar o número de moléculas de PE equivalente através da comparação com uma curva padrão feita partindo de partículas de calibração Rainbow com densidade de PE conhecida. A análise quantitativa revelou que as células CHO transfectadas com EGFR exibiam aproximadamente 350.000 moléculas na superfície de cada célula. A seguir, diluições em série de 5 vezes de anticorpos da invenção começando em 5 nM foram comparadas através da incubação com 10.000 células CHO transfectadas com EGFR em volumes crescentes, permitindo um excesso molar de anticorpo de pelo menos 5 vezes em relação ao antígeno de EGFR exibido na superfície em cada determinação. Os anticorpos foram incubados com as células durante 14 horas em um agitador, para promover a saturação total do antígeno em todas as concentrações de anticorpo testadas, enquanto o tampão de FACS foi adicionado 0,02% de NaN_3 e a temperatura foi mantida a 4°C para prevenir a internalização do receptor. Após a incubação, as células foram peletizadas a 1200 RPM durante 5 min a 4 °C e ressuspensas em 200 µL de tampão de FACS. A seguir, as células foram coradas com um FcGamma PE anti-IgG Humana $F(ab')_2$ de Cabra secundário diluído 1:500 e incubadas durante 30 min a 4°C em um agitador. Finalmente as células foram lavadas duas vezes em tampão de FACS e analisadas em um BD FACS array Bioanalyzer System com captura nas células CHO expressando EGFR exibindo propriedades de difusão uniforme para frente/lateral.

Reagentes de FACS:

Partículas de calibração Rainbow: BD, Cat. Nº: 559123

Tampão de FACS: 1xPBS + 2% de FCS + 0,02% de NaN_3

FcGamma PE anti-IgG Humana $F(ab')_2$ de Cabra: Jackson ImmunoResearch, Nº de Cat. 109-116-170

O ensaio de ligação de FACS descrito foi utilizado para a determinação da reatividade cruzada dos anticorpos para EGFR IgG 992 e 1024 e comparada à de um anticorpo de controle IgG 1320, que não fazia reação cruzada com o EGFR de cinomólogos. Como mostrado na Figura 40 abaixo, o ensaio de FACS descrito era muito bom na discriminação de anticorpos exibindo boa reatividade cruzada entre EGFR Humano e de cinomólogos de comprimento completo (Figura 40A, IgG 992 e Figura 40B, IgG 1024) e anticorpos específicos à espécie que reconhecem apenas o EGFR Humano de comprimento completo (Figura 40C, IgG 1320). Partindo desta análise foi concluído que ambas as IgGs 992 e 1024 exibiam excelente reatividade cruzada contra ambos os EGFRs Humano e de cinomólogos de comprimento completo expressos na superfície de células CHO transfectadas de forma estável. A diferença na ligação entre EGFR de cinomólgos e humano é surpreendente em vista do alto grau de similaridade de sequência e enfatiza a importância de testar os anticorpos em relação à ligação com a sequência-alvo exata nos animais utilizados para estudos toxicológicos pré-clínicos.

Exemplo 17. *Clones homólogos a 992, 1024 e 1030*

A seleção de clones de Anticorpos que se ligam ao EGFR, baseada em ensaios imunoabsorventes (ELISA e ensaios baseados em células), levou à identificação de clones 992, 1024, 1030 como descrito nos exemplos anteriores. Também foram identificados clones específicos ao EGFR, homólogos a 992, 1024, 1030 (Tabela 12).

É esperado que os clones que pertencem ao mesmo grupo possuam a mesma especificidade de ligação, mas podem se ligar com afinidades diferentes. Portanto, os clones dentro de um grupo podem substituir um outro nas composições de anticorpos da presente invenção, contanto que as afinidades de ligação dos clones não difiram muito.

Tabela 12

	IGHV						
Grupo	Nome do clone	Gene IGHV	Gene IGHJ	CDR3	SEQ ID NO	Número de mutações somáticas	Mutações somáticas
992	1209	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYISSGDAMDYW	110	4	H46P,G61R,G76A,H90Q
	1204	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSGDAMDYW	111	5	H46P,G59D,G61R,G76A,H90Q
	992	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSGDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q
	996	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSGDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q
	1033	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSGDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q
	1220	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSGDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q
1030	1195	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	K14R,M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	1030	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	M39L,K48R,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	1034	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	M39L,T55S,I56T,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	1194	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,D69G,I78M,K84R,T86I
	980	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	11	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I

Tabela 12 - continuação

	IGHV						
Grupo	Nome do clone	Gene IGHV	Gene IGHJ	CDR3	SEQ ID NO	Número de mutações somáticas	Mutações somáticas
	981	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	11	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y, Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	1246	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	11	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y, Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	1223	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	S32N,M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63 Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
1024	1031	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAMDYW	113	6	Y33H,K43Q,N57H,S74N,S84P,P94L
	1036	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAMDYW	113	6	Y33H,K43Q,N57H,S74N,S84P,P94L
	1042	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAMDYW	113	6	Y33H,K43Q,N57H,S74N,S84P,P94L
	984	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAMDYW	113	7	Y33H,K43Q,N57H,S74N,T79A,S84P, P94L
	1024	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEAMDYW	114	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L
	1210	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVMDYW	115	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L
	1217	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVMDYW	115	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L
	1221	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVMDYW	115	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L

Tabela 12 - continuação

	IGHV						
Grupo	Nome do clone	Gene IGHV	Gene IGHJ	CDR3	SEQ ID NO	Número de mutações somáticas	Mutações somáticas
992	1209	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
	1204	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
	992	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
	996	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	7	T8A,A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
	1033	IGKV10-94*03	IGKJ2*01	CQQFTTSPFTF	117	8	A25T,I29V,S30G,Y87F,N93S,L94M,P96G,I99V
	1220	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	118	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
1030	1195	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	K27Q,Y36F,Q44L
	1030	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L
	1034	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L
	1194	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L
	980	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F,Q44L,Q48R
	981	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F,Q44L,H92Y
	1246	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L
	1223	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L

Tabela 12 - continuação

	IGHV						
Grupo	Nome do clone	Gene IGHV	Gene IGHJ	CDR3	SEQ ID NO	Número de mutações somáticas	Mutações somáticas
1024	1031	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1036	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	T85A
	1042	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	G84R
	984	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1024	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1210	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	T17A
	1217	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1221	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	S32N
	1218	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	

Exemplo 18: Humanização dos anticorpos 922 e 1024

Todos os anticorpos contêm o potencial de ativar uma resposta antianticorpo humano. A resposta se correlaciona até alguma extensão com o grau de "natureza humana" do anticorpo terapêutico aplicado. É possível prever a imunogenicidade e dessa maneira o antianticorpo humano, mas há uma tendência em direção à preferência por anticorpos com um alto grau de natureza humana para uso clínico. A natureza humana dos anticorpos descritos na presente invenção pode ser aumentada através de um processo de humanização [Reichert JM. Monoclonal antibodies in the clinic. Nature Biotechnol, 2001;19:819-822; Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB e Dewitz MC. Monoclonal antibodies successes in the clinic. *Nature Biotechnol*, 2005; 23:1073-1078].

A humanização de um mAb murino é em princípio conseguida através do enxerto das regiões de determinação da complementaridade (CDRs) nas regiões estruturais humanas (FRs) dos domínios de IGHV e IGKV com sequência intimamente relacionada através de um procedimento comumente referido como enxerto de CDR (Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS e Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature, 1986;321:522-525). Entretanto, o enxerto simples de CDR de apenas regiões hipervariáveis pode resultar em uma menor afinidade devido ao fato de que alguns aminoácidos ou regiões estruturais fazem contatos cruciais com o antígeno ou sustentam a conformação das alças da CDR que se ligam ao antígeno [Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP e Waldmann TA. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. Proc Natl Acad Sci U.S.A, 1989; 86:10029-10033; Al-Lazikani B, Lesk AM e Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. J Mol Biol, 1997;273:927-948]. Consequentemente a humanização de anticorpos deve envolver o enxerto de ambas as alças de CDR das regiões variáveis derivadas do murino em uma estrutura humana quase homóloga enquanto são mantidos os resíduos estruturais murinos principais com influência documentada sobre a atividade de

ligação ao antígeno (Winter, G. e W. J. Harris. "Humanized antibodies." Immunol. Today 14.6 (1993): 243-46). Vários métodos foram desenvolvidos e aplicados de forma bem-sucedida para conseguir a humanização enquanto que a afinidade e a função do anticorpo são mantidas (revisado em Almagro, J. C. e J. Fransson. "Humanization of antibodies." Front Biosci. 13 (2008): 1619-33.). A humanização pode ser conseguida através de métodos lógicos, por exemplo, enxerto de CDR, remoldagem da superfície, super-humanização, otimização do conteúdo do filamento humano dos quais todos baseiam-se na construção de alguns candidatos a anticorpos humanizados. A sequência de aminoácidos dos candidatos baseia-se no entendimento e na previsão da estrutura do anticorpo e na contribuição dos aminoácidos individuais à ligação ao antígeno tanto diretamente quanto indiretamente através da estabilização da estrutura geral das regiões de interação com o antígeno. Geralmente, os candidatos têm que ser refinados e alguns aminoácidos mutados de volta para o resíduo murino original porque cada anticorpo possui algumas limitações individuais inesperadas. É comum para os métodos que várias rodadas sucessivas de planejamento, teste e replanejamento possam ser necessárias para manter a afinidade e as funções. As alternativas são os métodos mais empíricos em que bibliotecas combinatórias grandes são geradas e os anticorpos com as características desejadas são enriquecidos partindo do grupo de variantes através de uma seleção por métodos tal como exibição em levedura ou em fago ou métodos de seleção alternativos.

Os anticorpos anti-EGFR descritos na presente invenção podem ser humanizados através do enxerto de CDR nas regiões V humanas. No cenário preferido, a região V humana é selecionada com base na homologia em relação à região V murina original. As regiões do gene V humano com outras características desejadas tal como baixa imunogenicidade também podem ser utilizadas. O presente exemplo descreve um método que será utilizado para a humanização dos anticorpos quiméricos anti-EGFR 992 e 1024. As sequências humanizadas fornecidas na Figura 41A foram geradas através do enxerto das regiões CDR definidas do IMGT do 992 IGHV em IGHV1-46/IGHJ4 e do 992 IGKV em IGKV1-27/IGKJ1-01. As sequências de

aminoácidos fornecidas na Figura 41B foram geradas *in silico* através do enxerto das regiões CDR definidas do IMGT do 1024 IGHV em IGHV1-2*02/IGHJ6*02 e do 1024 IGKV em IGKV2-28*01/IGKJ2*01. Os genes artificiais que codificam os anticorpos humanizados especificados são sintetizados e inseridos no vetor de expressão de mamífero. Os anticorpos são expressos, purificados e testados em relação à atividade como descrito no Exemplo 3. Após o teste inicial, a cinética de ligação dos anticorpos humanizados pode ser determinada através da ressonância de plasmônio de superfície como descrito no Exemplo 14. Similarmente, a ligação ao hEGFR expresso na superfície de células pode ser determinada como descrito no Exemplo 15.

Se a atividade de ligação dos aminoácidos humanizados for significativamente menor que a observada para os anticorpos originais, um esquema de retromutação sequencial será empregado para a regeneração da afinidade, partindo dos resíduos estruturais humanizados localizados na zona de Vernier ou dos resíduos propostos por sustentarem a estrutura das regiões CDR (Foote, J. e G. Winter. "Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops." J Mol.Biol. 224.2 (1992): 487-99; Padlan, E. A. "Anatomy of the antibody molecule." Mol.Immunol 31.3 (1994): 169-217.). Estes resíduos estão na numeração do IMGT para o 992 IGHV nos números de aminoácidos 13, 45 e 80; 992 IGKV aminoácido 25; 1024 IGHV aminoácidos 13, 45, 80 e 82; 1024 IGKL aminoácido 78. Estes mutantes podem ser construídos através da utilização da mutagênese direcionada ao sítio mediada pela PCR utilizando métodos de biologia molecular padronizados. Os mutantes construídos serão testados como descrito anteriormente. É esperado que estes conjuntos de candidatos resultem em anticorpos humanizados com as propriedades de ligação ao antígeno mantidas. Entretanto, retromutações adicionais ou a maturação da afinidade através da introdução de substituições de aminoácidos nas regiões CDR através da mutagênese direcionada ao sítio não pode ser excluída.

Exemplo 19 Anticorpo com domínio variável dual

Uma proteína de anticorpo com domínio variável dual (DVD) é

engenheirada através da fusão dos domínios de IGHV de 992 e 1024 em tandem com um ligante de 6 aminoácidos (ASTKGP) e dos domínios de IGKV de 992 e 1024 com um ligante de 5 aminoácidos (TVAAP) [Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu RR, Santora L, vis-Taber R, Kunes Y, Fung E, Schwartz A, Sakorafas P, Gu J, Tarcsa E, Murtaza A e Ghayur T. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. Nature Biotechnol, 2007;25:1290-1297]. As fusões dos domínios duais de IGHV e IGKV são seguidas pelos domínios de IGHC e IGKC, respectivamente. Em um anticorpo DVD de comprimento completo (992L1024), os IGHV e IGKV do 992 são N-terminais, seguidos pelo ligador e os IGHV e IGKV do 1024, respectivamente. Em um segundo anticorpo DVD de comprimento completo (1024L992), os IGHV e IGKV do 1024 são N-terminais, seguidos pelo ligador e os IGHV e IGKV do 992, respectivamente. O DNA plasmideal que codifica os anticorpos 992 e 1024 é utilizado como molde para uma construção mediada pela PCR em duas etapas dos genes que codificam DVD. As duas regiões codificadoras do domínio variável de IGHV e IGKV são primeiramente amplificadas separadamente de forma que contenham regiões de extensão sobrepostas na posição da região codificadora do ligador (para o molde e as combinações de iniciadores, vide a Tabela 13 e a Tabela 14). O Gene IGKV que codifica o domínio variável proximal no terminal C é amplificado de forma que o gene que codifica o domínio constante da cadeia leve humana (IGKC) é incluído na sequência codificadora. As sequências codificadoras e as sequências de aminoácidos das subunidades dos anticorpos com domínio variável dual são mostradas no Apêndice 3.

A primeira PCR é preparada com a mistura a seguir em cada tubo (reações de 50 µL) para a obtenção da concentração final determinada: 1 × tampão FastStart (Roche), mistura de dNTPs (200 µM cada), iniciadores (10 pmoles cada) (vide a Tabela 14), FastStart High Fidelity Enzyme Blend (2,2 U; Roche) e 100 ng de molde do plasmídeo (vide a Tabela 14). A PCR foi submetida ao ciclo térmico a seguir: 2 min a 95°C, 20 × (30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C), 10 min a 72°C. Os produtos resultantes da PCR com

o tamanho correto provenientes da primeira reação da PCR (vide a Tabela 14) são purificados através da eletroforese preparatória em gel de agarose e utilizados em uma segunda etapa em que os dois domínios variáveis são unidos através da PCR com extensão por sobreposição. A segunda PCR, união dos fragmentos de DNA através da PCR com extensão por sobreposição, é preparada com a mistura a seguir em cada tubo (reações de 50 µL) para a obtenção da concentração final determinada: 1× tampão FastStart (Roche), mistura de dNTPs (200 µM cada), iniciadores (10 pmoles cada, vide a Tabela 15), FastStart High Fidelity Enzyme Blend (2,2 U; Roche) e molde (100 ng de fragmento de PCR, vide a Tabela 15). A PCR foi submetida ao ciclo térmico que é definido anteriormente. Os produtos resultantes da segunda etapa de PCR são purificados através da eletroforese preparatória em gel de agarose e tratados com enzimas de restrição, *Asc*I e *Xho*I para o IGHV dual e *Nhe*I e *Not*I para o IGKV dual (IGKC inclusive). Os fragmentos são ligados de forma consecutiva em um vetor de expressão de IgG de mamífero, 00-VP-002 (Figura 4), através de procedimentos padronizados de digestão com enzimas de restrição e ligação. O vetor plasmideal de expressão resultante é amplificado em *E. coli* e a preparação de plasmídeos é purificada através de métodos padronizados. Os anticorpos DVD são expressos e purificados como no Exemplo 2 e caracterizados em relação à atividade como nos Exemplos 3-13.

Outros ligadores podem ser testados se os anticorpos resultantes exibirem ligação reduzida ou nenhuma ao hEGFr-alvo.

Tabela 13: Iniciadores para a construção de anticorpos DVD partindo de 992 e 1024

SEQ ID NO	Nome do iniciador	Sequência
121	3'JH	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCCTTGAC
122	992_5'VH	CCAGCCGGGGCGCGCCGAGGTCCAACTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTG
123	1024_5'VH	CCAGCCGGGGCGCGCCCAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTG
124	992_5'VK	catgggaatagctagccGACATTCAGATGACTCAGACTACATCCTCCCTG
125	1024_5'VK	catgggaatagctagccGACATCGTGATGACACAAGCTGCATTCTCCAATC
126	Kappa3'	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTG
127	992H_O3'	CTGGGGGCCCTTGGTGCTGGCTGACGAGACGGTGACTGAGGTTC
128	1024H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCCAGGTCCAACTGCAGCAGC
129	1024H_O3'	CGGGGCCCTTGGTGCTGGCTGACGAGACGGTGACTGAG
130	992H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCGAGGTCCAACTGCAGCAAC
131	992K_O3'	GTCTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCCAGCTTGGTG
132	1024K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATCGTGATGACACAAGC
133	1024K_O3'	GTCTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCC
134	992K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATTCAGATGACTCAGACTAC

Tabela 14: Combinações de iniciadores e moldes para a 1ª etapa de PCR para a construção de genes que codificam DVD partindo de 992 e 1024

DVD	Molde para PCR	Iniciadores para a amplificação do Gene IGHV		Iniciadores para a amplificação do Gene IGKV	
		1ª etapa de PCR	1º produto da PCR (tamanho pb)	1ª etapa de PCR	1º produto da PCR (tamanho pb)
992L1024	992	992_5'VH 992H_O3'	992HO (406 pb)	992_5'VK 992K_O3'	992KO (359 pb)
	1024	1024H_O5' 3'JH	HO1024 (381 pb)	1024K_O5' Kappa3'	KO1024* (702 pb)
1024L992	992	992H_O5' 3'JH	HO992 (393 pb)	992K_O5' Kappa3'	KO992 (687 pb)
	1024	1024_5'VH 1024H_O3'	1024HO (392 pb)	1024_5'VK 1024K_O3'	1024KO* (374 pb)

*A sequência codificadora amplificada inclui o gene IGKC.

Tabela 15: Combinações de iniciadores e moldes para a 2ª etapa de PCR, ligação através da extensão em sobreposição, para a construção de genes que codificam DVD partindo de 992 e 1024

	IGHV			IGKV		
DVD	Molde	Iniciadores	Produto (pb)	Molde	Iniciadores	Produto (pb)
992L1024	992HO HO1024	992_5'VH 3'JH	766	992KO KO1024	992_5'VK Kappa3'	1040
1024L992	HO992 1024HO	1024_5'VH 3'JH	766	KO992 1024KO	1024_5'VK Kappa3'	1040

Exemplo 20: *Estudo de Toxicidade com Administração Intravenosa de 6 Semanas em Combinação com Erbitux no Macaco cinomólogos*

Objetivo do estudo: O objetivo do estudo era determinar a toxicidade do artigo de teste, 992+1024, após a administração intravenosa uma vez por semana ao macaco cinomólgos durante 6 semanas.

Uma vez que a toxicidade é um fator limitante da dose na prática clínica com inibidores de EGFR como Erbitux e Vectibix, foi considerado

importante em um estágio inicial avaliar a capacidade de tolerância de 992+1024 em uma dose clinicamente relevante. Isto foi enfatizado pelo fato de que 992+1024 parece estar agindo através de um mecanismo diferente que os outros produtos que se direcionam ao EGFR. Isto poderia potencialmente levar a novos efeitos adversos ou a uma piora dos efeitos observados com outros inibidores de EGFR.

Grupos de três fêmeas de macacos cinomólgos foram tratados com doses IV semanais de 992+1024 a 4/2,7 e 12/8 mg/kg e 12/8 mg/kg de Erbitux durante 6 semanas. As primeiras doses de 4 e 12 mg/kg sendo doses de carga e 2,7 e 8 mg/kg sendo doses de manutenção administradas 5 vezes. A dose de 12/8 mg/kg é equivalente à dose clínica humana de Erbitux administrada na prática clínica.

Planejamento do Estudo

Número do grupo	Descrição do grupo	Nível da Dose (mg/kg/dia)	Volume da dose (mL/kg)	Números de animais Fêmeas
1	Controle	0	19/12#	1-3
2	992+1024 Baixo	4,2/2,7#	19/12#	4-6
3	992+1024 Alto	12,6/8#	19/12#	7-9
4	Erbitux	12,6/8#	19/12#	10-12

O primeiro nível de dose é para a dose de carga, o segundo nível de dose é para a administração do Dia 8 em diante.

Os parâmetros a seguir foram acompanhados durante o estudo: Mortalidade, Sinais clínicos, Pesos corporais, Consumo de alimentos, Hematologia, Química clínica, Pesos dos órgãos, Observações macroscópicas.

Resultados

Mortalidade: Não houve mortes não programadas durante o curso do estudo.

Sinais clínicos: Nenhuma observação clínica adversa relacionada ao tratamento

Pesos corporais: Não havia efeito do tratamento com 992+1024 ou Erbitux sobre o peso corporal.

Consumo de alimentos: Não havia efeitos óbvios sobre o consumo de alimentos.

Hematologia: Não havia efeitos sobre os parâmetros hematológicos que sugerissem um efeito do tratamento com 992+1024 ou Erbitux.

Química clínica: Não havia alterações nos parâmetros químicos clínicos que sugerissem um efeito do tratamento com qualquer um dos artigos de teste.

Na Semana 4, um animal que recebeu dose de 4,2/2,7 mg/kg de 992+1024/dia tinha níveis maiores de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, em comparação aos valores pré-tratamento. Estes níveis voltaram para as faixas normais na Semana 6. Na ausência de um efeito similar em outros animais tratados, a significância toxicológica deste aumento nas enzimas do fígado é desconhecida.

Pesos dos órgãos: Não havia diferenças de significância toxicológica nos pesos dos órgãos entre os animais tratados e os de controle.

Observações macroscópicas: Não havia observações coerentes notadas na necropsia para sugerir um efeito de 992+1024 ou do Erbitux.

Conclusão preliminar: Os dados preliminares mostram que 992+1024 era bem-tolerado nas doses testadas e não foram observados quaisquer efeitos adversos relacionados ao tratamento.

Exemplo 21. Inibição do crescimento de linhagens de câncer de células pulmonares.

É sabido que as linhagens de células cancerosas pulmonares expressam EGFR com mutações no domínio da tirosina quinase (Steiner e outros Clin Cancer Res 13.5 (2007): 1540-51). Através de um método similar ao utilizado no exemplo 6, foi investigada a capacidade de uma combinação dos dois anticorpos 992 e 1024 de inibir o crescimento das linhagens de células cancerosas pulmonares HCC827 e H1975 que possuem mutações diferentes de EGFR.

Resultados

Como pode ser observado na Tabela 16 e na Tabela 17, a combinação de 992 e 1024 é capaz de inibir o crescimento de ambas as linha-

gens de células. A combinação é superior aos anticorpos monoclonais 992 e 1024 e ao Vectibix.

Tabela 16: Valores de IC50 e inibição máxima do crescimento dos anticorpos indicados contra a linhagem de células HCC827

HCC827	IC50 (µg/mL)	Inibição máxima
Erbitux	0,013	80%
Vectibix	0,100	60%
992	0,050	80%
1024	0,034	40%
992+1024	0,031	80%

Tabela 17: Valores de IC50 e inibição máxima do crescimento dos anticorpos indicados contra a linhagem de células H1975

H1975	IC50 (µg/mL)	Inibição máxima
Erbitux	0,010	30%
Vectibix	0,141	30%
992	0,056	30%
1024	-	0%
992+1024	0,024	30%

Apêndice 1. Sequências da região variável do anticorpo

>992VH (Seq. Nº 24)

cgcgccgaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctggtgaggcctggagcttcagtgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcct
tgagtggattgggaatatttatcctggtagtcgtagtactaactacgatgagaagttcaagagcaaggcc
acactgactgtagacacatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctg
cggtctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcggggatgctatggactactggggtca
aggaacctcagtcaccgtctcg

>1024VH (Seq. Nº 25)

cgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactggtggagcctgggggttcagtgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacaccttcaccagtcactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcct
tgagtggataggtgagattaatcctagcagcggtcgtaataactacaatgagaagttcaagagtaaggcc
acactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactctg

cggtctattattgtgtaagatactatggttacgacgaagctatggactactggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg
>1030VH (Seq. N° 26)
cgcgccgaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcactttcagtagttatgccctgtcttgggttcgccagactccagagaggaggct
ggagtgggtcgcatccattagtggtgttggtagcacctactttccagacagtgtgaagggccgtttcacc
atgtccagagataatgccaggaacatcctgtacctccaaatgagcagtctgaggtctgaggacacggcca
tgtattactgtgcaagaggttctgatggttacttctatgctatggactactggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg
>1042VH (Seq. N° 27)
cgcgcccaggtgcagcttcagcagcctggggctgaactggtgaagcctggggcttcagtgaagctgtcct
gtaaggcttctggctacaccttcaccagccactggatgcactgggtgcagcagaggcctggacaaggcct
tgagtggattggagagattcatcctagcaacggtcgtactaactacaatgagaagttcaagaacaaggcc
acactgactgtagacaaatctcccagcacagcctacatgcaactcagcagtttgacatctgaggactctg
cggtctattactgtgcaagatactatggttacgacgatgctatggactactggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg
>1208VH (Seq. N° 28)
cgcgccgaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcgctttcagtagctatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatacattggtagtggtgatgataatacccactatccagactctgtgaagggccgattc
accatctccagacacaatgccaaaaacaccctatacctgcaaatgagcagtctgaagtctgaggacacag
ccatgtattactgtgcaagacagaagtatggtaactacggggacactatggactactggggtcaaggaac
ctcagtcaccgtctcg
>1229\VH (Seq. N° 29)
cgcgcccaggttcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gctctgtctctggtttttcattaaccatctatggtgtacactgggttcgccagcctccaggaaagggtct
ggagtggctgggagttatgtgggctggtggaaatacagattataattcggctctcatgtccagactgaac
atcagcaaggacaattccaagagccaagttttcttaaaagtgaacagtctacaaactgatgacacagcca
tgtactattgtaccagagatcccgatggttactacgtggggtggttcttcgatgtctggggcgcggggac
cacggtcaccgtctcg
>1254VH (Seq. N° 30)
cgcgccgaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcct

gtgcagcctctggattcgcttacagtacctatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatacattagtagtggtggtgatgccgcctactatcccgacactgtgaagggccgattc
accatctccagagacaatgccaaaaacaccctatacctgcaaatgagcagtctgaagtctgaggacacag
ccatgtattactgtgcgaggtctcgctatggaaactacggggacgctatggactactggggtcaaggaac
ctcagtcaccgtctcg

>1257VH (Seq. Nº 31)

cgcgccgaggtccagctgcaacagtctggacctgagctggtgaaacctggggcttcagtgaagataccct
gcaagacttctggatacactttcactgactacaacatggcctgggtgaagcagagccatggaaagagcct
tgagtggattggagatattattcctaacaatggtggtgctatctacaaccagaaattcaagggcaaggcc
actttgactgtagacaaatcctccagtacagcctccatggagctccgcagcctgacatctgaggacactg
cagtctatttctgtgcaagaaagaatatctactataggtacgacggggcaggtgctctggactactgggg
tcaaggaacctcagtcaccgtctcg

>1260VH (Seq. Nº 32)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gcactgtctctgggttttcattaaccacctatggggtacactgggttcgccagcctccaggaaagggtct
ggagtggctgggagtaatatgggctggtggaagcacaaattataattcggctctcatgtccagactgagc
atcaagaaagacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagcca
tgtactactgtgccagagcctatggttacaactttgactattggggccaaggcaccactctcacagtctc
g

>1261VH (Seq. Nº 33)

cgcgccgaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcct
gtgcagtctctggattcactttcagtagctatgtcatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcaaccattactagtggtggtaggaacatctactatctagacagtgtgaaggggcgattc
actatctccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaggtctgaggacacgg
ccatgtattactgtgcaagacatgaggactataggtacgacggttactatgctatggactactggggtca
aggaacctcagtcaccgtctcg

>1277VH (Seq. Nº 34)

cgcgccgaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagagtccttgaaactctcct
gtgcagcctctggattcgctttcagttactctgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatacatgagtagtgctggtgatgtcaccttctattcagacactgtgaagggccgattc
accatctccagagacaatgccaagaacaccctgtatctgcaagtgagcagtctgaagtctgaggacacag
ccatatattactgtgtaagacaccgggacgtggctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgt

ctcg

>1284VH (Seq. Nº 35)

cgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactggtgaagcctggggcttcagtgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacaccttcaccagcgactggatgcactggatgaaacagaggcctggacaaggcct
tgagtggattggagagattaatcctagtaacggtcgctctagctacaatgagaagttcaagagcaaggcc
acactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctg
cggtctattactgtgcaagaataggtggtatctacgtggagacttactggggccaagggactctggtcac
tgtctcg

>1308VH (Seq. Nº 36)

cgcgccgaggtccagcttcagcagtctggagctgagctggtgaggcctgggtcctcagtgaagatttcct
gcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaggcagaggcctggacagggtct
tgagtggattggacagatttatcctggagatggtgatactaactacaatggaaagttcaagggtagagcc
acactgactgcaaacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctaacatctgaggactctg
cggtctatttctgtgcaagaagggcatcttccctctatgatgtttacccctactactttgactactgggg
ccaaggcaccactctcacagtctcg

>1320VH (Seq. Nº 37)

cgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactggtgaagcctggggcttcaatgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacaccttcaccaactactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcct
tgaatggattggagaaattaatcctagcaacggtcgtactaattacaatgagaagttcaagagcaaggcc
acactgactgtagacaaatcgtccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctg
gggtctattactgtgcaaaaggggggaactactatgattacgactgggactactggggccaaggcaccac
tctcacagtctcg

>1344VH (Seq. Nº 38)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gcactgtctctgggttttcattaaccatctatggtgtacactgggttcgccagcctccaggaaagggtct
ggagtggctgggagtaatatgggctggtggaaacacaaattataattcggctctcatgtccagactgagc
atcagcaaagacaactccaagagtcaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagcca
tgtacttctgtgccagaggctatggctacaatttagactattggggccaaggcaccactctcacagtctc
g

>1347VH (Seq. Nº 39)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccatcacat
gcaccgtctcaggattctcattaaccggccatggtgtaaactgggttcgccagcctccaggaaagggtct

ggagtggctgggaatgatatggggtgatggaagcacggactataattcaactctcaaatccagactgagt
atcagcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcagactgatgacaccgcca
ggtactactgtgccagaggctacggctacctttactactttgactactggggccaaggcaccactctcac
agtctcg

>992VH (Seq. Nº 40)

RAEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIYPGSRST
NYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYYVSSGDAMDYWGQGTS
VTVS

>1024VH (Seq. Nº 41)

RAQVQLQQPGAELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSSGRN
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYYGYDEAMDYWGQGTSVTVS

>1030VH (Seq. Nº 42)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYALSWVRQTPERRLEWVASISGVGSTY
FPDSVKGRFTMSRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARGSDGYFYAMDYWGQGTSVTVS

>1042VH (Seq. Nº 43)

RAQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVQQRPGQGLEWIGEIHPSNGRT
NYNEKFKNKATLTVDKSPSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYGYDDAMDYWGQGTSVTVS

>1208VH (Seq. Nº 44)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYIGSGDDNT
HYPDSVKGRFTISRHNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARQKYGNYGDTMDYWGQGTSVT
VS

>1229VH (Seq. Nº 45)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCSVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGLEWLGVMWAGGNTD
YNSALMSRLNISKDNSKSQVFLKVNSLQTDDTAMYYCTRDPDGYYVGWFFDVWGAGTTVT
VS

>1254VH (Seq. Nº 46)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAYSTYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGDAA
YYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARSRYGNYGDAMDYWGQGTSVT
VS

>1257VH (Seq. Nº 47)

RAEVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYTFTDYNMAWVKQSHGKSLEWIGDIIPNNGGA
IYNQKFKGKATLTVDKSSSTASMELRSLTSEDTAVYFCARKNIYYRYDGAGALDYWGQGT

SVTVS

>1260VH (Seq. Nº 48)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTTYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN

YNSALMSRLSIKKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARAYGYNFDYWGQGTTLTVS

>1261VH (Seq. Nº 49)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGFTFSSYVMSWVRQTPEKRLEWVATITSGGRNI

YYLDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARHEDYRYDGYYAMDYWGQGTS

VTVS

>1277VH (Seq. Nº 50)

RAEVQLVESGGGLVKPGESLKLSCAASGFAFSYSDMSWVRQTPEKRLEWVAYMSSAGDVT

FYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQVSSLKSEDTAIYYCVRHRDVAMDYWGQGTSVTVS

>1284VH (Seq. Nº 51)

RAQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSDWMHWMKQRPGQGLEWIGEINPSNGRS

SYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARIGGIYVETYWGQGTLVTVS

>1308VH (Seq. Nº 52)

RAEVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVRQRPGQGLEWIGQIYPGDGDT

NYNGKFKGRATLTANKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRASSLYDVYPYYFDYWGQGT

TLTVS

>1320VH (Seq. Nº 53)

RAQVQLQQPGAELVKPGASMKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSNGRT

NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSGVYYCAKGGNYYDYDWDYWGQGTTLTV

S

>1344VH (Seq. Nº 54)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGNTN

YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYFCARGYGYNLDYWGQGTTLTVS

>1347VH (Seq. Nº 55)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGHGVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGSTD

YNSTLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYCARGYGYLYYFDYWGQGTTLTVS

>992VL (Seq. Nº 56)

ctagccgacattcagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca

gttgcaggacaagtcaggacattggcaattatttaaactggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa

actcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctgga

acagatttttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatgttgccacttacttttgccaacactata
atacggttcctccgacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1024VL (Seq. Nº 57)

ctagccgacatcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatct
cctgcaggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgtattggtatctgcagaagcc
aggccagtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgcctcaggagtcccagacaggttcagt
agcagtgggtcaggaactgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtgtttatt
actgtgctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgt
ggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtg
tgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgg
gtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgac
gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcg
cccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1030VL (Seq. Nº 58)

ctagccgacattgtgctgactcagtctcctgcttccttagctgtatctctggggcagagggccaccattt
catgcagggccagcaaaagtgtcagtacatctggctatagttttatgcactggtaccaactgaaaccagg
acagccacccaaactcctcatctatcttgcatccaacctagaatctggggtccctgccaggttcagtggc
agtgggtctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtggaagaggaggatgctgcaacctattact
gtcagcacagtagggagtttccgttaacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1042VL (Seq. Nº 59)

gatattgtgatgactcaggctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatctcctgca
ggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgtattggtatctgcagaagccaggcca

gtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgcctcaggagtcccagacaggttcagtagcagt
gggtcaagaactgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtgtttattactgtg
ctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgc
accatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctg
ctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaact
cccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag
caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtc
acaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1208VL (Seq. Nº 60)

ctagccgatgttgtgatgactcagactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatct
cttgcagatctagtcagagccttgtacacagtaatggaaacacctatttacattggtacctgcagaagcc
aggccagtctccaaaactcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagt
ggcagtggatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctgggagtttatt
tctgctctcaaagtacacatgttcccacgttcggaggggggaccaagctggaaatcaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1229VL (Seq. Nº 61)

ctagccgacattgtgatgacccagtctcacaaattcatgtccacatcagtgggagacagggtcagcatca
cctgcaaggccagtcaggatgtgactaatgccgtagcctggtatcaacaaaaaccaggacaatctcctaa
actactgatttactgggcatccatccgacacactggagtccctgatcgcttcacaggcagtagatctggg
acagattatactctcaccatcaacagtgtgcaggctgaagacctggccctttattattgtcagcaacatt
ataacactccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1254VL (Seq. Nº 62)

ctagccgatgttgtgatgacacagactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatct

cttgcagatctagtcagagccttgtacacagtaatggtaacacctatttacattggtacctgcagaagcc
aggccagtctccaaagctcctgctctacaaagtttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagt
ggcagtggatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggagtctgaggatctgggagtttatt
tctgctctcaaaatacacatgtgtacacgttcggagggggggacaaagttggaaataaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1257VL (Seq. Nº 63)

ctagcccaaattgtgctcacacagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatga
cctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatttactggtaccagcagaagccaggatcctcccccagact
cctgatttatgacgcatccaacctggcttctggagtccctgttcgcttcagtggcagtgggtctgggacc
tcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtggagca
gttacccaatcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt
catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc
tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtg
tcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttc
aacaggggagagtgt

>1260VL (Seq. Nº 64)

ctagccgatatccagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca
gttgcagtgcaagtcagggcattaccaattatttaaactggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctattactcatcaagtttacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggg
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagtata
gtgagattccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1261VL (Seq. Nº 65)

ctagcccaaattgtgctgacccagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccataa
cctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatgcactggttccagcagaagccaggcacttctcccaaact
ctggatttatagtacatccaacctggcttctggagtccctgctcgcttcagtggcagtggatctgggacc
tcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcaaaggagta
gttacccatacacgttcggaggggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt
catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc
tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtg
tcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttc
aacaggggagagtgt

>1277VL (Seq. N° 66)

ctagccgatgttgtgatgacccagactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatct
cttgcagatctagtcagagccttgtacacagtaatggaaacacctatttacattggtacctgcagaagcc
aggccagtctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagt
ggcagtggatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctgggagtttatt
tctgctctcaaagtacacatgttccgacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1284VL (Seq. N° 67)

ctagccgacattgtgctaacacagtctcctgcttccttagctgtatctctggggcagagggccaccatct
catgcagggccagccaaagtgtcagtacatctacctatagttatatgcactggtatcaacagaaatcagg
acagccacccaaactcctcatcaagtatgcatccaacctagagtctggggtccctgccaggttcagtggc
agtgggtctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtggaggaggaggatactgcaacatattact
gtcagcacagttgggagattccgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1308VL (Seq. Nº 68)

ctagccgacatccagatgacacaaactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca
gttgcagggcaagtcaggacattagcaattatttaaactggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
agtcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctgga
acagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggta
atacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1320VL (Seq. Nº 69)

ctagccgacattcagatgacccagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca
gttgcagtgcaagtcaggacattagcaattatttaaactggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctatcacacatcaactttacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggg
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcaatata
gtaagcttccgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1344VL (Seq. Nº 70)

ctagccgacattcagatgacacagactacttcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatta
gttgcagtgcaagtcagggcattagtaattatttaaactggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctattacacatcaagtttacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggg
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagtata
gtaagcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc

ttcaacaggggagagtgt

>1347VL (Seq. Nº 71)

ctagccgaaaatgtgctgactcagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggaaaaggtcaccatga
cctgcagggccagctcaagtgtaagttccagttacttgcactggtaccagcaaaagtcaggtgcctcccc
caaactctggatttatagcacatccaacttggcttctggagtccctgctcgcttcagtggcagtgggtct
gggacctcttactctctcacagtcaacagtgtggagactgaagatgctgccacttattactgccaccagt
acagtggtttcccattcacgttcggctcggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatc
tgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaat
aacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccagg
agagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagc
agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag
agcttcaacaggggagagtgt

>992VL (Seq. Nº 72)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV
PSRFSGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1024VL (Seq. Nº 73)

LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1030VL (Seq. Nº 74)

LADIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSFMHWYQLKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPLTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1042VL (Seq. Nº 75)

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA
SGVPDRFSSSGSRTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1208VL (Seq. Nº 76)

LADVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSN

RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGGGTKLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1229VL (Seq. Nº 77)

LADIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTNAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASIRHTGV

PDRFTGSRSGTDYTLTINSVQAEDLALYYCQQHYNTPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST

LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1254VL (Seq. Nº 78)

LADVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLLYKVSN

RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYFCSQNTHVYTFGGGTKLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1257VL (Seq. Nº 79)

LAQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYIYWYQQKPGSSPRLLIYDASNLASGVP

VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPITFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL

TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1260VL (Seq. Nº 80)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYSSSLHSGV

PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSEIPYTFGGGTKLELKRTVAAPSVFIF

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST

LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1261VL (Seq. Nº 81)

LAQIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVP

ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPYTFGGGTKLELKRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL

TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1277VL (Seq. Nº 82)

LADVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSN

RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGGGTKLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1284VL (Seq. Nº 83)

LADIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKSGQPPKLLIKYASNL

ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPWTFGGGTKLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1308VL (Seq. Nº 84)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKVLIYYTSRLHSGV

PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST

LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1320VL (Seq. Nº 85)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSTLHSGV

PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST

LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1344VL (Seq. Nº 86)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGV

PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST

LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1347VL (Seq. Nº 87)

LAENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKLWIYSTSNLASG

VPARFSGSGSGTSYSLTVNSVETEDAATYYCHQYSGFPFTFGSGTKLELKRTVAAPSVFI

FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS

TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Apêndice 2. Sequências da região constante do anticorpo

>Região do IGKC humano (Seq. Nº 88)

ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataact

tctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagag

tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagac

tacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagct

tcaacaggggagagtgttaataagcggccgccggtggaggcggt

>Região do IGKC humano (Seq. Nº 89)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS

KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Éxon1 1..298

Íntron 299..689

Éxon2 690..734

Íntron 735..852

Éxon3 853..1182

Íntron 1183..1279

Éxon4 1280..1602

>sequência genômica do domínio constante do IGHG1 humano (Seq. Nº 90)

agtgcctccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacag

cggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccct

gaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtg

accgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacca

aggtggacaagagagttggtgagaggccagcacagggagggagggtgtctgctggaagccaggctcagcg

ctcctgcctggacgcatcccggctatgcagtcccagtccagggcagcaaggcaggccccgtctgcctctt

cacccggaggcctctgcccgccccactcatgctcagggagagggtcttctggctttttccccaggctctg

ggcaggcacaggctaggtgcccctaacccaggccctgcacacaaaggggcaggtgctgggctcagacctg

ccaagagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaagcccaccccaaaggccaaactctccactccc

tcagctcggacaccttctctcctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaaatct

tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccaggtaagccagcccaggcctcgccctccagctcaaggc

gggacaggtgccctagagtagcctgcatccagggacaggccccagccgggtgctgacacgtccacctcca

tctcttcctcagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacac

cctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtc

aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaca

acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaa

gtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggtgggacc

cgtggggtgcgagggccacatggacagaggccggctcggcccaccctctgccctgagagtgaccgctgta

ccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggaga

tgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg

ggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttc

ttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtga

tgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaatga

>IGHG1 (Seq. Nº 91)

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP

EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA

LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV

LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Apêndice 3. Sequências de anticorpo com domínio variável dual

>992L1024\IGHV (Seq. Nº 92)

ggcgcgccgaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctggtgaggcctggagcttcagtgaagctgtc

ctgcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggc

cttgagtggattgggaatatttatcctggtagtcgtagtactaactacgatgagaagttcaagagcaagg

ccacactgactgtagacacatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactc

tgcggtctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcggggatgctatggactactggggt

caaggaacctcagtcaccgtctcgtcagccagcaccaagggcccccaggtccaactgcagcagcctgggg

ctgaactggtggagcctgggggttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcaccagtca

ctggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggataggtgagattaatcctagcagc

ggtcgtaataactacaatgagaagttcaagagtaaggccacactgactgtagacaaatcctccagcacag

cctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactctgcggtctattattgtgtaagatactatggtta

cgacgaagctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcgag

>992L1024\IGKV (Seq. Nº 93)

gctagccgacattcagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatc

agttgcaggacaagtcaggacattggcaattatttaaactggtatcagcagaaaccagatggaactgtta

aactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctgg

aacagatttttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatgttgccacttactttgccaacactat

aatacggttcctccgacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccagaca

tcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatctcctgcaggtc

tagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgtattggtatctgcagaagccaggccagtct

cctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgcctcaggagtcccagacaggttcagtagcagtgggt
caggaactgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtgtttattactgtgctca
aaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgcacca
tctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctga
ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccca
ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaa
gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaa
agagcttcaacaggggagagtgttaataagcggccgc

>1024L992\IGHV (Seq. Nº 94)

ggcgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactggtggagcctgggggttcagtgaagctgtc
ctgcaaggcttctggctacaccttcaccagtcactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggc
cttgagtggataggtgagattaatcctagcagcggtcgtaataactacaatgagaagttcaagagtaagg
ccacactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactc
tgcggtctattattgtgtaagatactatggttacgacgaagctatggactactggggtcaaggaacctca
gtcaccgtctcgtcagccagcaccaagggccccgaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctggtga
ggcctggagcttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactg
ggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggattgggaatatttatcctggtagtcgtagtactaac
tacgatgagaagttcaagagcaaggccacactgactgtagacacatcctccagcacagcctacatgcagc
tcagcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtag
cggggatgctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcgag

>1024L992\IGKV (Seq. Nº 95)

gctagccgacatcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatc
tcctgcaggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgtattggtatctgcagaagc
caggccagtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgcctcaggagtcccagacaggttcag
tagcagtgggtcaggaactgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtgtttat
tactgtgctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactg
tggctgcaccagacattcagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcac
catcagttgcaggacaagtcaggacattggcaattatttaaactggtatcagcagaaaccagatggaact
gttaaactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggt
ctggaacagatttttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatgttgccacttacttttgccaaca
ctataatacggttcctccgacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcacca
tctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctga

ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccca
ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaa
gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaa
agagcttcaacaggggagagtgttaataagcggccgc

>992L1024\IGHV (Seq. N° 96)

RAEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIYPGSRST
NYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYYVSSGDAMDYWGQGTS
VTVSSASTKGPQVQLQQPGAELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPGQGLEWIG
EINPSSGRNNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYYGYDEAMDYW
GQGTSVTVS

>992L1024\IGKV (Seq. N° 97)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV
PSRFSGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPDIVMT
QAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPD
RFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1024L992\IGHV (Seq. N° 98)

RAQVQLQQPGAELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSSGRN
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYYGYDEAMDYWGQGTSVTVS
SASTKGPEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIYP
GSRSTNYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYYVSSGDAMDYW
GQGTSVTVS

>1024L992\IGKV (Seq. N° 99)

LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKRTVAAP
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de anticorpos recombinantes que compreende pelo menos 3 moléculas de anticorpo anti-EGFR distintas, em que os anticorpos se ligam a um primeiro, um segundo e um terceiro epitopos distintos de EGFR.

2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que os epitopos são não-sobrepostos.

3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos uma molécula de anticorpo distinta é capaz de inibir a ligação do EGF.

4. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos uma molécula de anticorpo distinta é capaz de prevenir a fosforilação de EGFR.

5. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos uma molécula de anticorpo distinta é capaz de aumentar a internalização/degradação de EGFR.

6. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, que compreende pelo menos uma molécula de anticorpo anti-EGFR distinta adicional, em que o dito anticorpo adicional se liga a um quarto epitopo distinto.

7. Anticorpo de acordo com a reivindicação 6, que compreende pelo menos uma molécula de anticorpo anti-EGFR distinta adicional, em que o dito anticorpo adicional se liga a um quinto epitopo distinto.

8. Anticorpo de acordo com a reivindicação 7, que compreende pelo menos uma molécula de anticorpo anti-EGFR distinta adicional, em que o dito anticorpo adicional se liga a um sexto epitopo distinto.

9. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, que compreende pelo menos um anticorpo para o domínio III e pelo menos um anticorpo para o domínio I/II.

10. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, que compreende pelo menos dois anticorpos para o domínio III e um anticorpo para o domínio I.

11. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, que compreende pelo menos dois anticorpos para o domínio III, tais como pelo menos três

anticorpos para o domínio III.

12. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, que compreende pelo menos um anticorpo que é capaz de aumentar a ligação de pelo menos um anticorpo adicional a um epitopo distinto diferente.

13. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que os anticorpos são anticorpos quiméricos com cadeias variáveis murinas e cadeias constantes humanas.

14. Anticorpo de acordo com a reivindicação 13, em que a cadeia constante humana é IgG1 ou IgG2.

15. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos um anticorpo é um anticorpo humanizado.

16. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos um anticorpo é um anticorpo humano.

17. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que o EGFR é selecionado do grupo que consiste em EGFR humano, EGFR humano mutado e variações de deleção de EGFR humano.

18. Anticorpo de acordo com a reivindicação 17, em que o EGFR é EGFR tanto humano quanto de primata não-humano.

19. Composição de anticorpos recombinantes que compreende pelo menos 2 moléculas de anticorpos para EGFR distintas, em que uma molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste em anticorpos que possuem as CDRs dos anticorpos: 992, 1024, 1030, 1042, 1208, 1229, 1254, 1257, 1260, 1261, 1277, 1284, 1308, 1320, 1344 e 1347.

20. Composição de anticorpos recombinantes de acordo com a reivindicação 19, em que pelo menos uma molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste em anticorpos que possuem as CDRs dos anticorpos 992, 1030, 1024, 1347, 1277, 1254, 1320, 1260, 1261 e 1284.

21. Composição de anticorpos recombinantes de acordo com a reivindicação 19, em que duas moléculas de anticorpos para EGFR distintas são selecionadas do grupo de combinações que consistem em anticorpos

com as CDRs dos anticorpos: 992+1030, 992+1024, 992+1042, 992+1320, 1277+1024.

22. Composição de anticorpos que compreende pelo menos 2 moléculas de anticorpos anti-EGFR humano distintas,

a. em que uma primeira molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 992, um anticorpo que compreende as sequências da VL (aminoácidos 3-109 da SEQ ID NO: 72) e da VH (aminoácidos 3-124 da SEQ ID NO: 40) do anticorpo 992, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 992 (SEQ ID NO: 116 e 111), um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 992 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 992 ao EGFR humano; e

b. em que uma segunda molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências da VL (aminoácidos 3-114 da SEQ ID NO: 73) e da VH (aminoácidos 3-120 da SEQ ID NO: 41) do anticorpo 1024, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1024 (SEQ ID NO: 120 e 114), um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 1024 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 1024 ao EGFR humano.

23. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que

a. a dita primeira molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 992, um anticorpo que compreende as sequências da VL e da VH do anticorpo 992, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 992 e um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 992; e

b. a dita segunda molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências da VL e da VH do anticorpo 1024, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1024 e um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 1024.

24. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que

a. a dita primeira molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 992, um anticorpo que com-

preende as sequências da VL e da VH do anticorpo 992 e um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 992; e

b. a dita segunda molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências da VL e da VH do anticorpo 1024 e um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1024.

25. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que

a. a dita primeira molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 992 e um anticorpo que compreende as sequências da VL e da VH do anticorpo 992; e

b. a dita segunda molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1024 e um anticorpo que compreende as sequências da VL e da VH do anticorpo 1024.

26. Composição de acordo com a reivindicação 22, que compreende os anticorpos 992 e 1024.

27. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que os primeiro e segundo anticorpos anti-EGFR não inibem a ligação ao EGFR humano de cada outro.

28. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que pelo menos um dos anticorpos é capaz de aumentar a capacidade de ligação máxima do outro anticorpo em relação ao EGFR humano.

29. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que a proporção do primeiro anticorpo em relação ao segundo anticorpo na composição está entre 5 e 95%, tal como entre 10 e 90%, preferencialmente entre 20 e 80%, mais preferencialmente entre 30 e 70, mais preferencialmente entre 40 e 60, tal como entre 45 e 55, tal como aproximadamente 50%.

30. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que os primeiro e segundo anticorpos são do isotipo IgG1 ou IgG2.

31. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que o anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 992 é selecionado do grupo de anticorpos que compreende os clones de 1209, 1204, 992, 996, 1033 e 1220.

32. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que o anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 1024 é selecionado do grupo de anticorpos que compreende os clones de 1031, 1036, 1042, 984, 1024, 1210, 1217, 1221 e 1218.

33. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que o anticorpo que compreende a CDR3 do anticorpo 992 compreende adicionalmente a CDR1 e a CDR2 da VH e da VL do anticorpo 992.

34. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que o anticorpo que compreende a CDR3 do anticorpo 1024 compreende adicionalmente a CDR1 e a CDR2 da VH e da VL do anticorpo 1024.

35. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que o anticorpo que compete com o anticorpo 992 é selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 1208, 1254 e 1277.

36. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que o anticorpo que compete com o anticorpo 1024 é selecionado do grupo que consiste nos anticorpos 1042 e 1320.

37. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que a composição não contém anticorpos anti-EGFR adicionais em adição ao primeiro e ao segundo anticorpos.

38. Composição de acordo com a reivindicação 22, que compreende ainda um terceiro anticorpo anti-EGFR distinto, em que a dita terceira molécula de anticorpo anti-EGFR distinta é selecionada do grupo que consiste no anticorpo 1030, um anticorpo que compreende as sequências da VL (aminoácidos 3 a 114 da SEQ ID NO: 74) e da VH (aminoácidos 3-120 da SEQ ID NO: 42) do anticorpo 1030, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1030 (SEQ ID NOs 112 e 119), um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 1030 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 1030 ao EGFR humano.

39. Composição de acordo com a reivindicação 37, em que o dito terceiro anticorpo resulta em uma maior ligação ao EGFR humano do dito primeiro e/ou segundo anticorpo.

40. Composição de acordo com a reivindicação 37, em que o

anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que o anticorpo 1030 é selecionado do grupo de anticorpos que consiste nos clones de 1195, 1030, 1034, 1194, 980, 981, 1246 e 1223.

41. Composição de acordo com a reivindicação 37, em que o anticorpo que compreende a CDR3 do anticorpo 1030 compreende adicionalmente a CDR1 e a CDR2 da VH e da VL do anticorpo 1030.

42. Composição de acordo com a reivindicação 38, em que a composição não contém anticorpos anti-EGFR adicionais em adição aos ditos primeiro, segundo e terceiro anticorpos.

43. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que os anticorpos distintos são preparados para administração simultânea, sucessiva ou separada.

44. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que a composição leva à internalização do receptor.

45. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que a composição leva à regressão de tumores A431NS *in vivo*.

46. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que a composição é capaz de induzir a diferenciação terminal em células A431NS *in vivo*.

47. Composição de acordo com a reivindicação 22, em que a composição é capaz de regular para mais a expressão da involucrina do tumor *in vivo*.

48. Molécula de ligação biespecífica que possui as especificidades de ligação da composição de anticorpos como definida na reivindicação 22.

49. Molécula de ligação biespecífica de acordo com a reivindicação 48, que compreende as CDRs dos anticorpos 992 e 1024.

50. Molécula de ligação biespecífica de acordo com a reivindicação 48, que é um anticorpo com domínio variável dual.

51. Molécula de ligação biespecífica de acordo com a reivindicação 48, que é um fragmento Fab biespecífico ou um scFV biespecífico.

52. Processo para a produção de composição de anticorpos que

compreende:

a) a transfecção de uma primeira população de células eucarióticas com um primeiro construto de expressão que codifica um primeiro anticorpo que compreende um primeiro par cognato de cadeias de V_H e V_L capaz de se ligar a um primeiro epitopo de EGFR distinto;

b) a transfecção de uma segunda população de células eucarióticas com um segundo construto de expressão que codifica um segundo anticorpo que compreende um segundo par cognato de cadeias de V_H e V_L capaz de se ligar a um segundo epitopo de EGFR distinto;

c) a repetição opcional da etapa b) para as terceiras ou populações adicionais, construtos de expressão, pares cognatos e epitopos de EGFR;

d) a seleção da primeira, da segunda e opcionalmente populações de células adicionais transfectadas;

e) a combinação das populações transfectadas em um recipiente para a obtenção de um banco de células;

f) o cultivo das células partindo do banco de células sob condições que permitem a expressão dos anticorpos; e

g) a recuperação e a purificação da composição de anticorpos do sobrenadante.

53. Processo de acordo com a reivindicação 52, em que a composição de anticorpos é uma composição de anticorpos como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 18.

54. Processo de acordo com a reivindicação 52, em que as células são transfectadas com integração específica ao sítio.

55. Processo de acordo com a reivindicação 52, em que as cadeias de VH e de VL são murinas e as regiões constantes dos anticorpos são humanas.

56. Processo de acordo com a reivindicação 55, em que todos os anticorpos compreendem a mesma região constante de cadeia pesada.

57. Banco de células que compreende pelo menos duas subpopulações de células eucarióticas; cada subpopulação transfectada ou trans-

duzida com um construto de expressão que codifica um anticorpo que compreende um par cognato de cadeias de V_H e V_L capaz de se ligar a um epitopo de EGFR distinto.

58. Banco de células de acordo com a reivindicação 57, em que o banco de células codifica uma composição de anticorpos como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 18.

59. Banco de células de acordo com a reivindicação 57, em que as células são transfectadas utilizando integração específica ao sítio.

60. Processo de redução da sinalização do EGFR que compreende a administração a uma composição de células que expressam EGFR de uma composição de anticorpos como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 47 ou da molécula de ligação biespecífica como definida em qualquer uma das reivindicações 48 a 51 e a redução da sinalização do EGFR.

61. Processo para matar células que expressam EGFR que compreende a administração a uma composição de células que expressam EGFR de uma composição de anticorpos como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 47 ou da molécula de ligação biespecífica como definida em qualquer uma das reivindicações 48 a 51 e a morte das células que expressam EGFR.

62. Processo de indução da apoptose em células que expressam EGFR, que compreende a administração a uma composição de células que expressam EGFR de uma composição de anticorpos como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 47 ou da molécula de ligação biespecífica como definida em qualquer uma das reivindicações 48 a 51, induzindo assim à apoptose.

63. Processo de inibição da proliferação de células que expressam EGFR que compreende a administração a uma composição de células que expressam EGFR de uma composição de anticorpos como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 47 ou da molécula de ligação biespecífica como definida em qualquer uma das reivindicações 48 a 51, inibindo assim a proliferação.

64. Processo de indução da diferenciação de células tumorais *in vivo*, que compreende a administração a um indivíduo que sofre de câncer de uma composição de anticorpos como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 47 ou da molécula de ligação biespecífica como definida em qualquer uma das reivindicações 48 a 51, induzindo assim à diferenciação das células tumorais.

65. Processo de acordo com a reivindicação 64, em que a dita diferenciação é terminal.

66. Processo de acordo com a reivindicação 64, em que a dita diferenciação é acompanhada por um aumento na expressão da involucrina.

67. Processo para indução da internalização do EGFR que compreende a administração às células que expressam EGFR de uma quantidade eficaz de uma composição de anticorpos como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 47 ou da molécula de ligação biespecífica como definida em qualquer uma das reivindicações 48 a 51, induzindo assim à internalização do EGFR.

68. Composição farmacêutica que compreende dois ou mais anticorpos como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 47 ou a molécula de ligação biespecífica como definida em qualquer uma das reivindicações 48 a 51, na forma de uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia de câncer.

69. Artigos de acordo com a reivindicação 68, que compreendem ainda pelo menos um composto capaz de induzir à diferenciação de células cancerosas na forma de uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia de câncer.

70. Artigos de acordo com a reivindicação 69, em que o composto é selecionado do grupo que consiste no ácido retinóico, do fenilbutirato, do ácido todo-trans-retinóico, da forma ativa da vitamina D.

71. Artigos de acordo com a reivindicação 68, que compreendem ainda e pelo menos um composto quimioterapêutico ou antineoplásico na forma de uma combinação para a administração simultânea, separada ou

sucessiva na terapia de câncer.

72. Artigos de acordo com a reivindicação 71, em que o composto quimioterapêutico é selecionado do grupo que consiste em adriamicina, cisplatina, taxol, doxorrubicina, topotecano, fluoropirimidina, oxaliplatina e irinotecano.

73. Polinucleotídeo selecionado do grupo que consiste em

a. Um ácido nucleico que possui a sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID NO: 100;

b. um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 101;

c. um ácido nucleico que possui a sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID NO: 102;

d. um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 103; e

e. um ácido nucleico que possui a sequência complementar de qualquer um de a. a d.

74. Vetor de expressão que compreende um ácido nucleico como definido na reivindicação 73, ligado de forma operacional a uma sequência promotora capaz de direcionar a expressão do dito ácido nucleico.

75. Célula transfectada ou transduzida com o vetor de expressão como definido na reivindicação 74.

76. Polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 101.

77. Polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 103.

78. Processo para a seleção de anticorpos em relação à ligação ao EGFR de cinomólgo, que compreende as etapas de

a. fornecimento de pelo menos um anticorpo de teste;

b. realização de um ensaio para determinar a ligação do anticorpo

i) ao domínio extracelular do EGFR de cinomólgo (SEQ ID NO: 101) ou do EGFR de cinomólgo de comprimento completo (SEQ ID NO:

103); ou

ii) à superfície das células que expressam o domínio extracelular do EGFR de cinomólgo (SEQ ID NO: 101) ou que expressam o EGFR de cinomólgo de comprimento completo (SEQ ID NO: 103);

c. e seleção de pelo menos um anticorpo que se liga ao domínio extracelular do EGFR de cinomólgo.

79. Processo de acordo com a reivindicação 78, que compreende ainda a seleção em relação à ligação ao domínio extracelular do EGFR humano ou à ligação às células que expressam o EGFR humano.

80. Processo para a identificação de anticorpos anti-EGFR capazes de aumentar a ligação simultânea de outro anticorpo anti-EGFR ao EGFR, o dito processo compreendendo

a. em um primeiro ensaio, a determinação da capacidade de ligação máxima de um primeiro anticorpo em relação a uma quantidade fixa de antígeno de EGFR,

b. em um segundo ensaio, a saturação de uma quantidade fixa de antígeno de EGFR com um segundo anticorpo anti-EGFR,

c. o contato do complexo EGFR-anticorpo com o dito primeiro anticorpo e a determinação da capacidade de ligação máxima e

d. a comparação das capacidades de ligação para determinar se a capacidade de ligação máxima da etapa c. excede a capacidade de ligação máxima da etapa a.

81. Processo de acordo com a reivindicação 80, em que o dito antígeno de EGFR é uma proteína recombinante imobilizada sobre uma superfície sólida.

82. Processo de acordo com a reivindicação 80, em que o dito antígeno de EGFR é apresentado na superfície de uma célula que expressa EGFR.

83. Processo de acordo com a reivindicação 82, em que a célula compreende um construto de expressão que codifica EGFR.

84. Processo de acordo com a reivindicação 80, em que o primeiro anticorpo é uma imunoglobulina e o dito segundo anticorpo é um

fragmento Fab.

85. Processo de acordo com a reivindicação 80, em que os ensaios são ELISA.

86. Processo de acordo com a reivindicação 80, em que o antígeno de EGFR compreende o domínio extracelular do EGFR humano (SEQ ID NO: 108) ou o domínio extracelular do EGFR de cinomólgo (SEQ ID NO: 101).

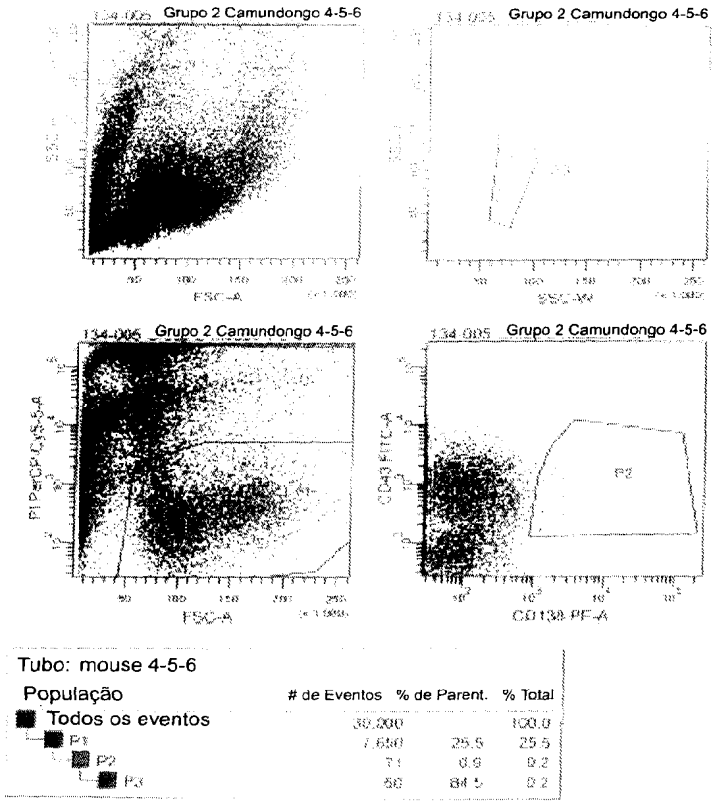

Grupo 2 Camundongo 4-5-6
Grupo 2 Camundongo 4-5-6
Grupo 2 Camundongo 4-5-6
Grupo 2 Camundongo 4-5-6
P2
FSC-A
CD138-PE-A
Tubo: mouse 4-5-6
População
Todos os eventos
P1
P2
P3
de Eventos
% de Parent.
% Total
30.000
7.650
71
50
25.5
0.9
84.5
100.0
25.5
0.2
0.2

FIG. 1

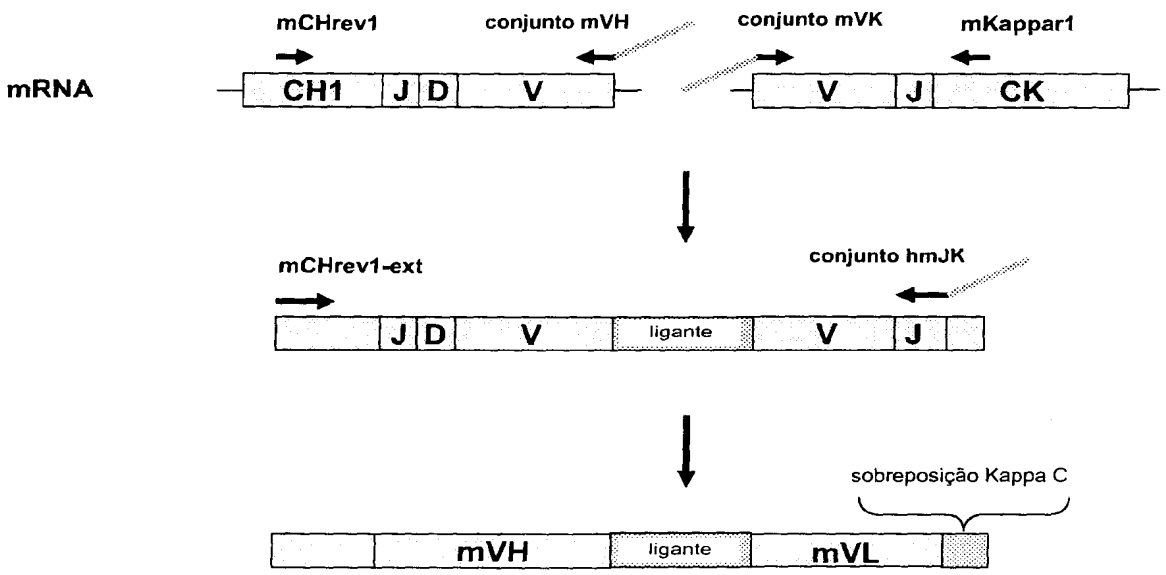

mRNA
mCHrev1
conjunto mVH
conjunto mVK
mKappar1
CH1
J
D
V
V
J
CK
mCHrev1-ext
conjunto hmJK
J
D
V
ligante
V
J
sobreposição Kappa C
mVH
ligante
mVL

Fig. 2

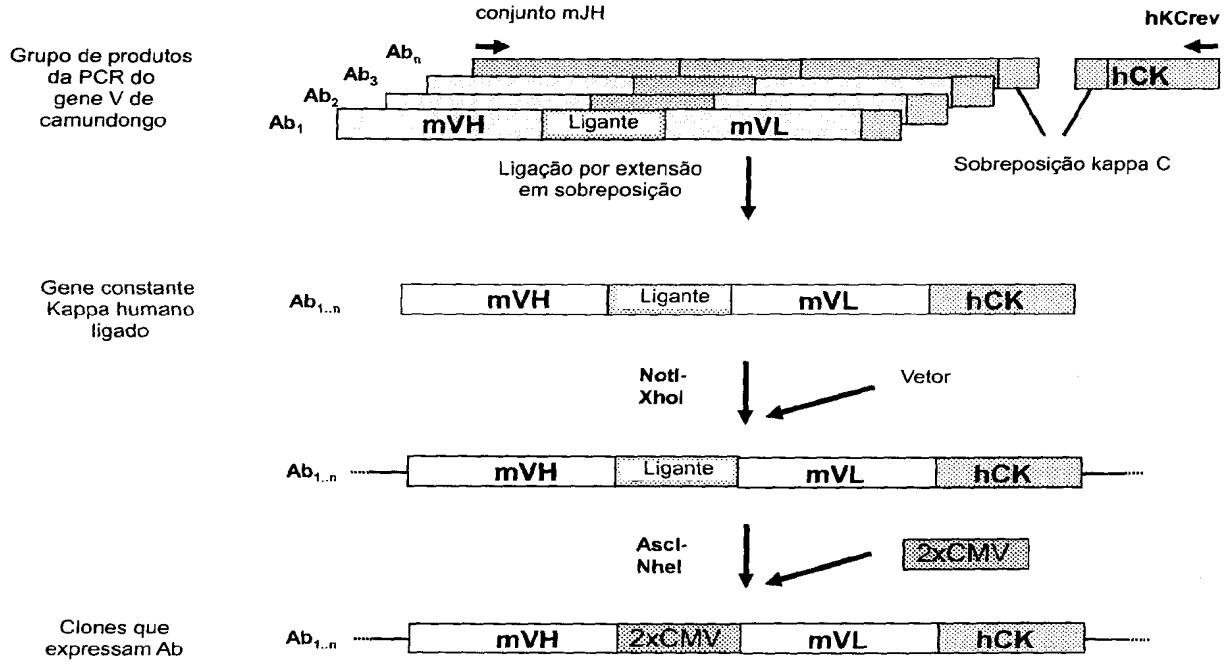
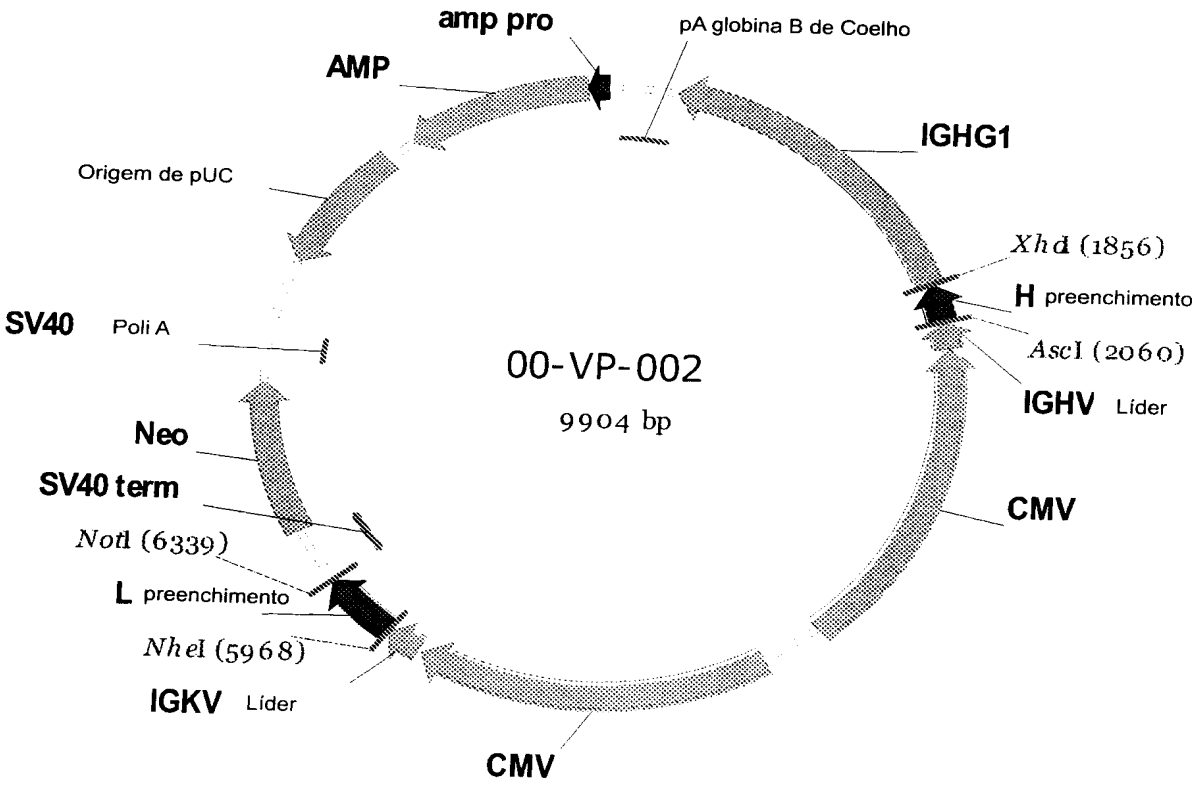

conjunto mJH
hKCrev
Grupo de produtos da PCR do gene V de camundongo
Ab$_n$
Ab$_3$
Ab$_2$
Ab$_1$
mVH
Ligante
mVL
hCK
Ligação por extensão em sobreposição
Sobreposição kappa C
Gene constante Kappa humano ligado
Ab$_{1..n}$
mVH
Ligante
mVL
hCK
NotI-
XhoI
Vetor
Ab$_{1..n}$
mVH
Ligante
mVL
hCK
AscI-
NheI
2xCMV
Clones que expressam Ab
Ab$_{1..n}$
mVH
2xCMV
mVL
hCK

Fig. 3


amp pro
pA globina B de Coelho
AMP
IGHG1
Origem de pUC
Xhd (1856)
H preenchimento
SV40 Poli A
AscI (2060)
00-VP-002
9904 bp
IGHV Líder
Neo
CMV
SV40 term
NotI (6339)
L preenchimento
NheI (5968)
IGKV Líder
CMV

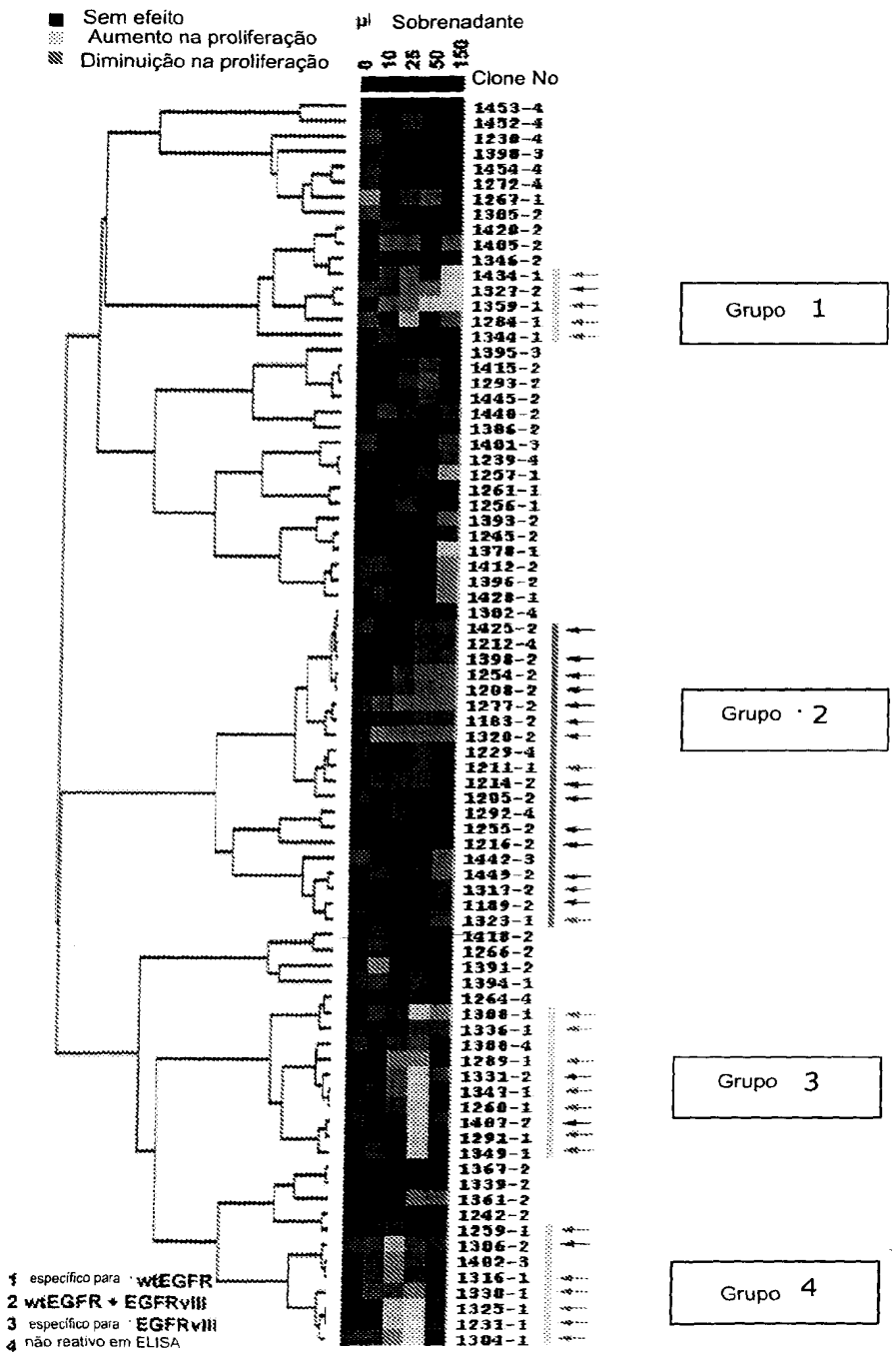

Sem efeito
Aumento na proliferação
Diminuição na proliferação
µl Sobrenadante
0 10 25 50 150
Clone No
1453-4
1452-4
1238-4
1398-3
1454-4
1272-4
1267-1
1385-2
1428-2
1405-2
1346-2
1434-1
1327-2
1359-1
1284-1
1344-1
1395-3
1415-2
1293-2
1445-2
1448-2
1386-2
1401-3
1239-4
1257-1
1261-1
1256-1
1393-2
1245-2
1378-1
1412-2
1396-2
1428-1
1382-4
1425-2
1212-4
1398-2
1254-2
1208-2
1277-2
1183-2
1320-2
1229-4
1211-1
1214-2
1205-2
1292-4
1255-2
1216-2
1442-3
1449-2
1313-2
1189-2
1323-1
1418-2
1266-2
1391-2
1394-1
1264-4
1388-1
1336-1
1388-4
1289-1
1331-2
1343-1
1260-1
1407-2
1291-1
1349-1
1367-2
1339-2
1361-2
1242-2
1259-1
1386-2
1402-3
1316-1
1338-1
1325-1
1231-1
1304-1
Grupo 1
Grupo 2
Grupo 3
Grupo 4
1 específico para wtEGFR
2 wtEGFR + EGFRvIII
3 específico para EGFRvIII
4 não reativo em ELISA

Fig. 5

	I		II	III			
Clone	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2
992	-20	-2	-21	-3	-14	76	77
1024	11	18	11	12	27	3	75
1030	12	-20	-35	92	92	91	-1
1042	-7	7	-29	-7	15	24	81
1208	-21	-3	-10	84	89	82	20
1229							
1257	78	92	77	25	33	6	37
1260	90	92	12	17	24	12	8
1261	57	88	30	6	13	3	6
1277	32	28	8	77	65	61	20
1284	88	82	9	31	30	12	26
1308	71	81	19	0	12	4	11
1320	2	8	0	6	7	9	-9
1344	82	82	40	28	36	19	14
1428	91	94	34	11	17	18	14
Erbitux	-17	4	-4	21	-73	78	68
Erbitux	-22	2	-5	22	-81	78	68
Vectibix	-30	-12	-24	6	57	60	42
Vectibix	-13	-1	-6	16	64	68	46

Fig. 6A

	I		II	III				epítopo
Clone	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2	Especificidade
992						+++	+++	Domínio III
1024					+		+++	Domínio III
1030				+++	+++	+++		Domínio III
1042							+++	Domínio III
1208				+++	+++	+++		Domínio III
1229								Desconhecido
1257	+++	+++	+++	+	+		+	Domínio I / II
1260	+++	+++						Domínio I
1261	++	+++	+					Domínio I
1277	+	+		+++	+++	++		Domínio III
1284	+++	++		+	+		+	Domínio I
1308	++	+++						Domínio I
1320								Desconhecido
1344	+++	+++	+	+	+			Domínio I
1428	+++	+++	+					Domínio I
Erbitux						+++	++	Domínio III
Erbitux						+++	++	Domínio III
Vectibix					++	++	+	Domínio III
Vectibix					++	++	+	Domínio III

Fig. 6B

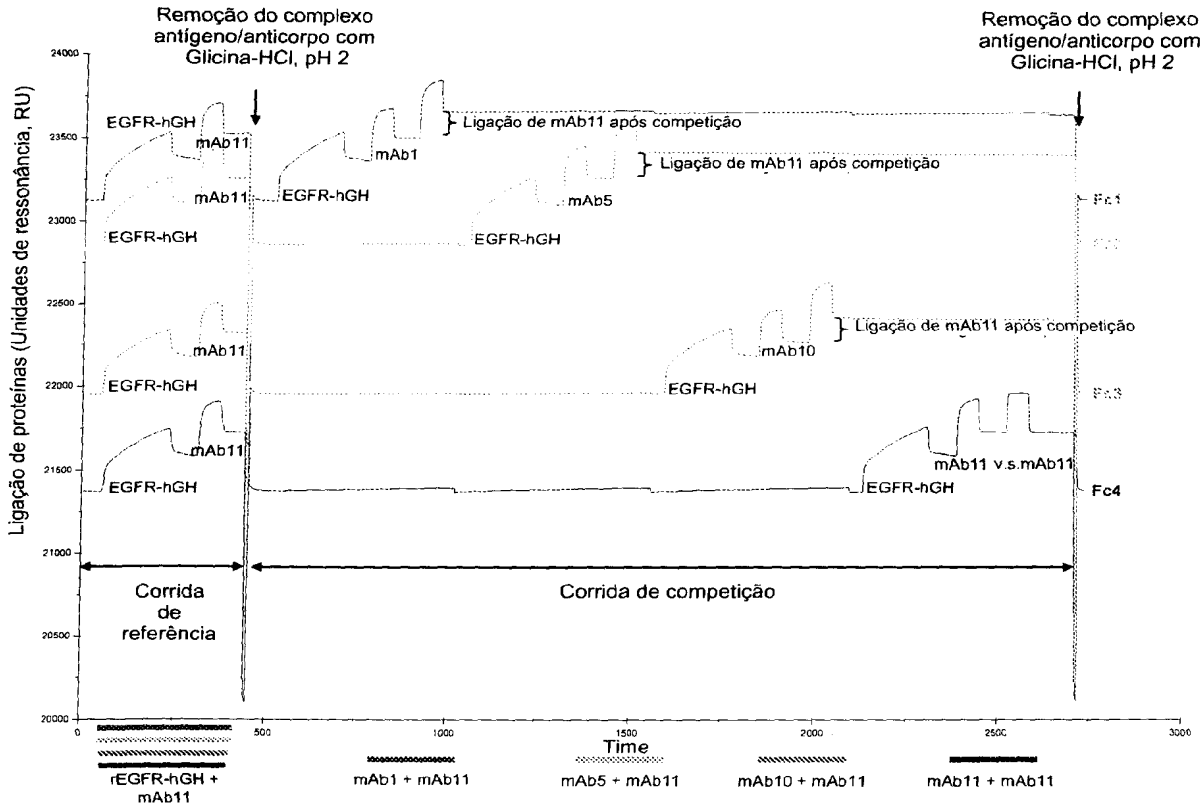

Remoção do complexo antígeno/anticorpo com Glicina-HCl, pH 2
Remoção do complexo antígeno/anticorpo com Glicina-HCl, pH 2
Ligação de proteínas (Unidades de ressonância, RU)
EGFR-hGH
mAb11
mAb1
Ligação de mAb11 após competição
mAb5
mAb10
mAb11 v.s.mAb11
Fc1
Fc2
Fc3
Fc4
Corrida de referência
Corrida de competição
Time
rEGFR-hGH + mAb11
mAb1 + mAb11
mAb5 + mAb11
mAb10 + mAb11
mAb11 + mAb11

Fig. 7

	I		II	III				
Clone	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Erbitux	Vectibix
992	-4	-3	7	1	-4	99	90	106
1024	-3	-13	0	0	-5	6	104	102
1030	94	-5	6	104	84	98	-1	16
1042	-6	-8	0	10	-4	14	107	110
1208	5	4	5	66	32	37	18	29
1229*								
1257	22	100	85	-5	1	-1	0	-2
1260	91	99	54	1	12	7	8	10
1261	24	94	54	-3	-6	-4	-2	-5
1277	5	3	10	85	62	81	60	86
1284	86	-15	9	-13	-8	-9	-7	-13
1308	15	85	11	-4	-3	-5	-6	-8
1320	-3	-6	2	-3	-2	3	2	6
1344	87	86	25	-3	0	-2	-4	-5
1347	17	86	11	-1	-1	-3	-4	-6
1428	77	88	42	0	1	0	2	0
Erbitux	-3	-3	0	29	0	101	94	104
Vectibix	0	-4	5	0	0	88	79	102

Fig. 8A

	I		II	III				Especificidade ao epítopo
Clone	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Erbitux	Vectibix	
992						+++	+++	+++	Domínio III
1024							+++	+++	Domínio III
1030	++			+++	+++	+++			Domínio III
1042							+++	+++	Domínio III
1208				++	+	+		+	Domínio III
1229*									sem ligação
1257		+++	+++						Domínio I / II
1260	+++	+++	++						Domínio I / II
1261		+++	++						Domínio I / II
1277				+++	++	+++	++	+++	Domínio III
1284	+++								Domínio I
1308		+++							Domínio I
1320									Desconhecido
1344	+++	+++							Domínio I
1347		+++							Domínio I
1428	+++	+++	+						Domínio I / II
Erbitux				+		+++	+++	+++	Domínio III
Vectibix						+++	+++	+++	Domínio III

Fig. 8B

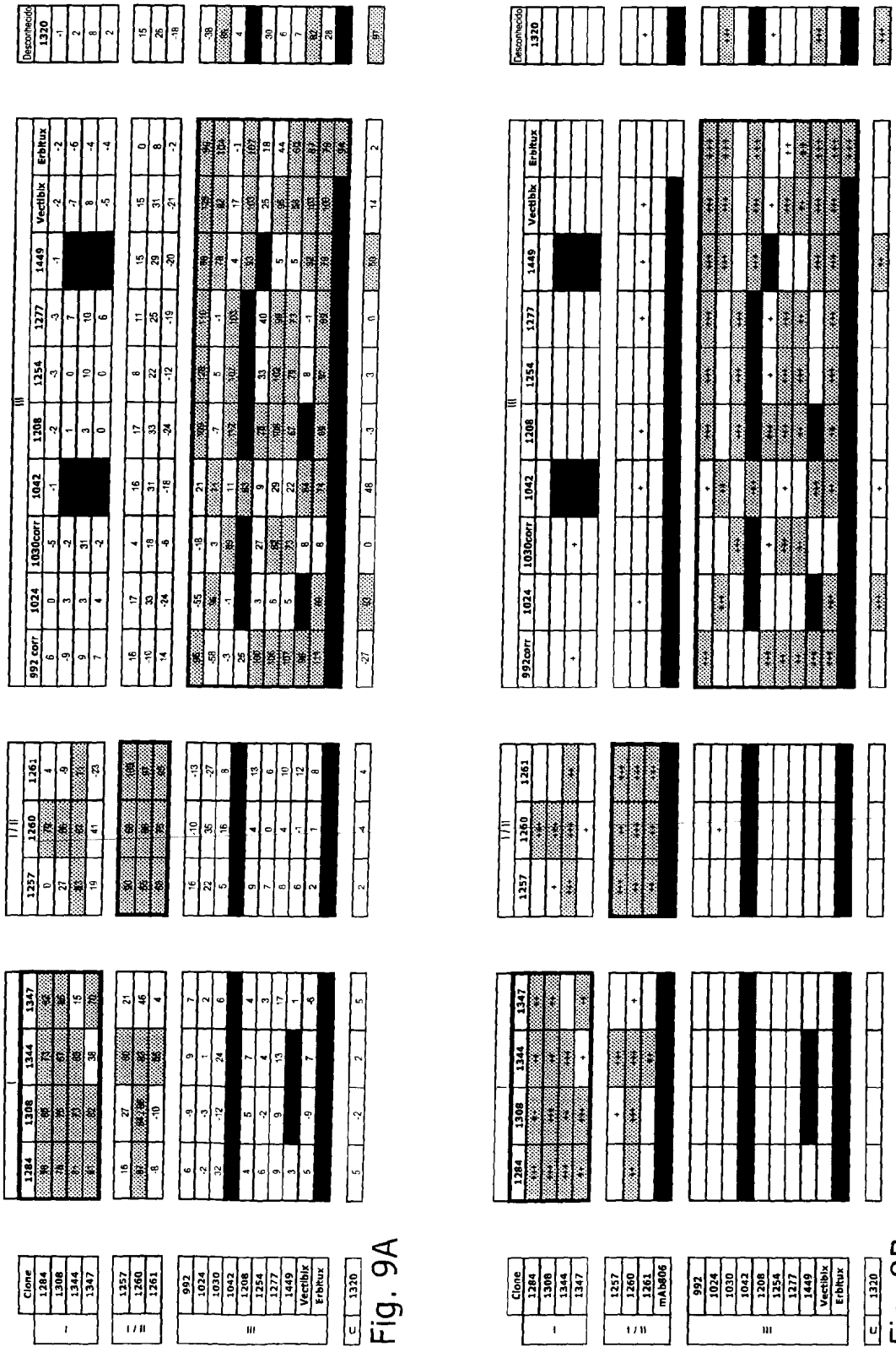

Clone
1284
1308
1344
1347
I
1257
1260
1261
I / II
992
1024
1030
1042
1208
1254
1277
1449
Vectibix
Erbitux
III
C
1320
Desconhecido
mAb806

Fig. 9A

Fig. 9B

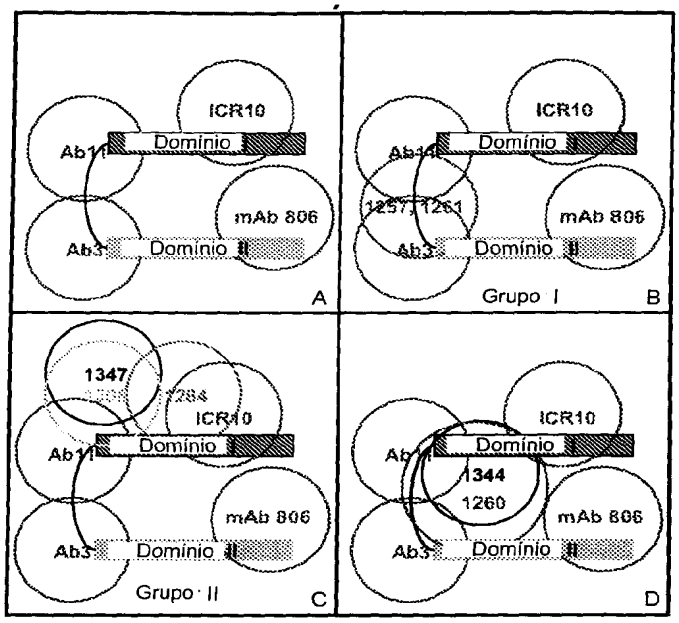


Fig. 10A

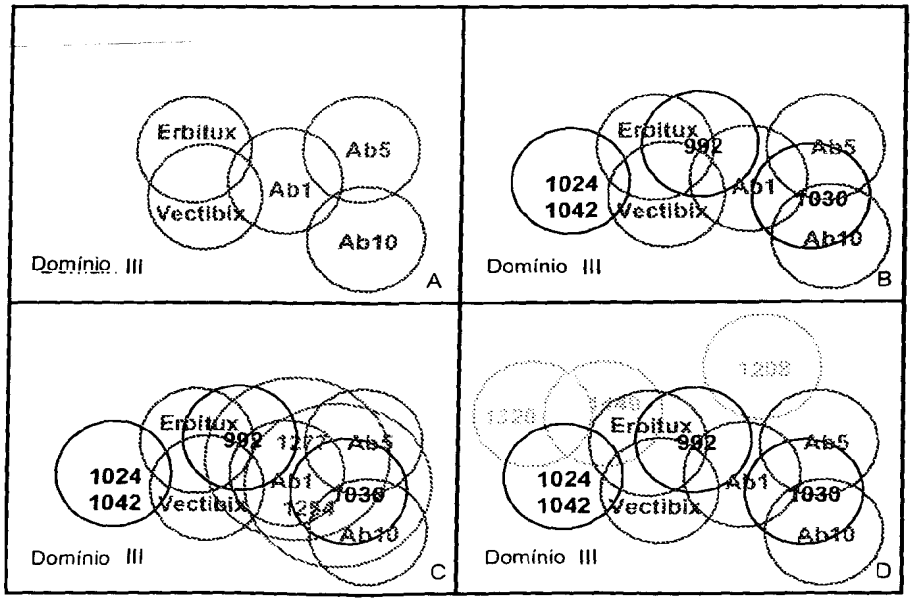


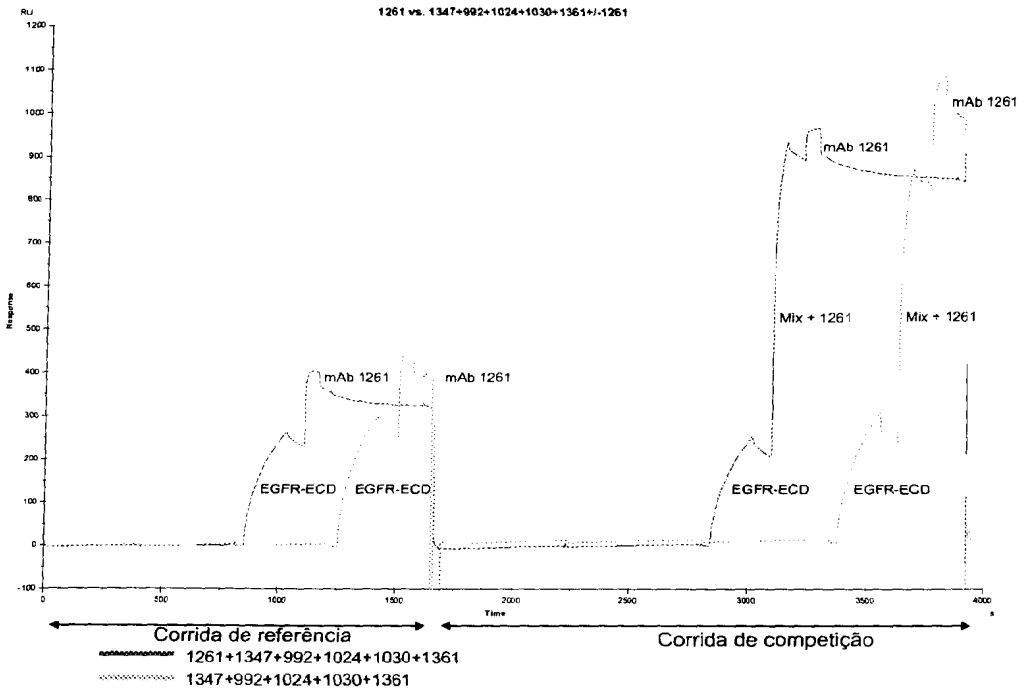
Fig. 10B

mAb da amostra	Inibição mAb da Amostra	Ciclo de Referência Rumax	Ciclo de Competição Rumax
Domínio III **992**	**1030 Vs. 992** -6	81	85^^
Domínio III **1024**	**992 + 1030 Vs. 1024** -26	100	126^^
Domínio I/II **1261**	**992 + 1030 + 1024 Vs. 1261** -13	157	177^^
Domínio I **1347**	**992 + 1030 + 1024** -5	75	79^^
Domínio desconhecido **1361**	**992+1030+1024 Vs. 1361** -11	162	181^^

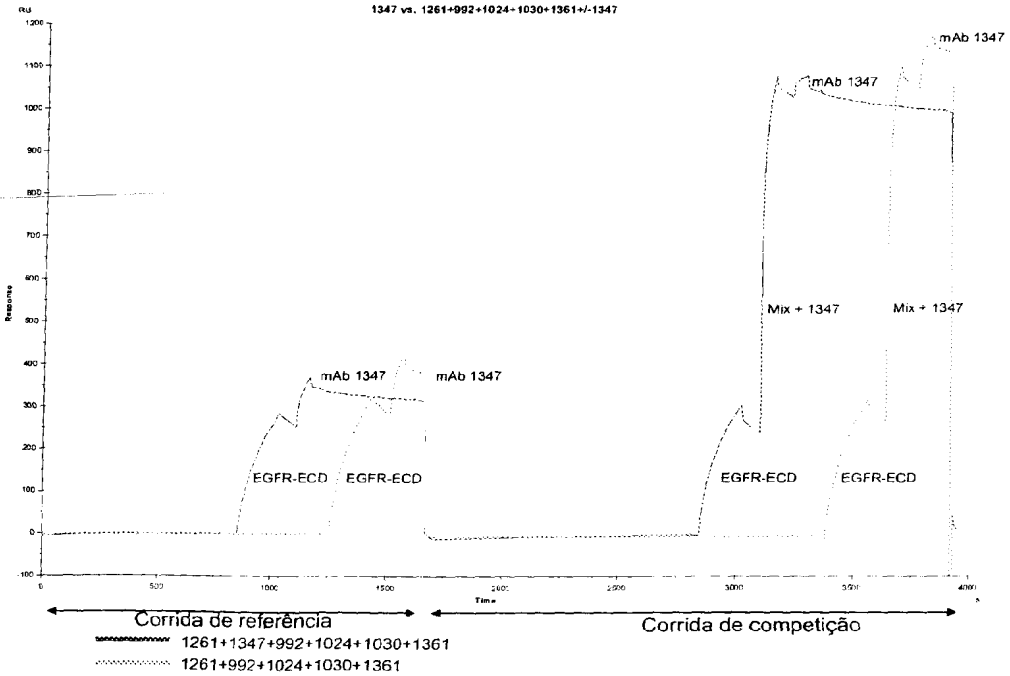
Fig. 11A

mAb da Amostra	Mistura de anticorpos (N=6) 1261+1347+992+1024+1030+1361			Mistura de anticorpos (N=6-1) Sem mAb da amostra testado		
	Inibição mAb da Amostra	Ciclo de Referência Rumax	Ciclo de Competição Rumax	Inibição mAb da Amostra	Ciclo de Referência Rumax	Ciclo de Competição Rumax
Domínio I/II **1261**	**1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1261** 95	135	7	**1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1261** -21	139	168^^
DomínioI **1347**	**1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1347** 80	91	19	**1261+992+1024+1030+1361 Vs. 1347** 15	107	92
Domínio III **992**	**1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 992** 116	85	-14*	**1261+1347+1024+1030+1361 Vs. 992** -58	71	111^^
Domínio III **1024**	**1261+1347+992+1024+1030+1361** 113	110	-14*	**1261+1347+992+1030+1361 Vs. 1024** -25	122	152^^
Domínio III **1030**	**1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1030** 87	87	12	**1261+1347+992+1024+1361 Vs. 1030** -10	74	82^^
Domínio desconhecido **1361**	**1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1361** 102	178	-3*	**1261+1347+992+1024+1030 Vs. 1361** 4	159	152

Fig. 11B

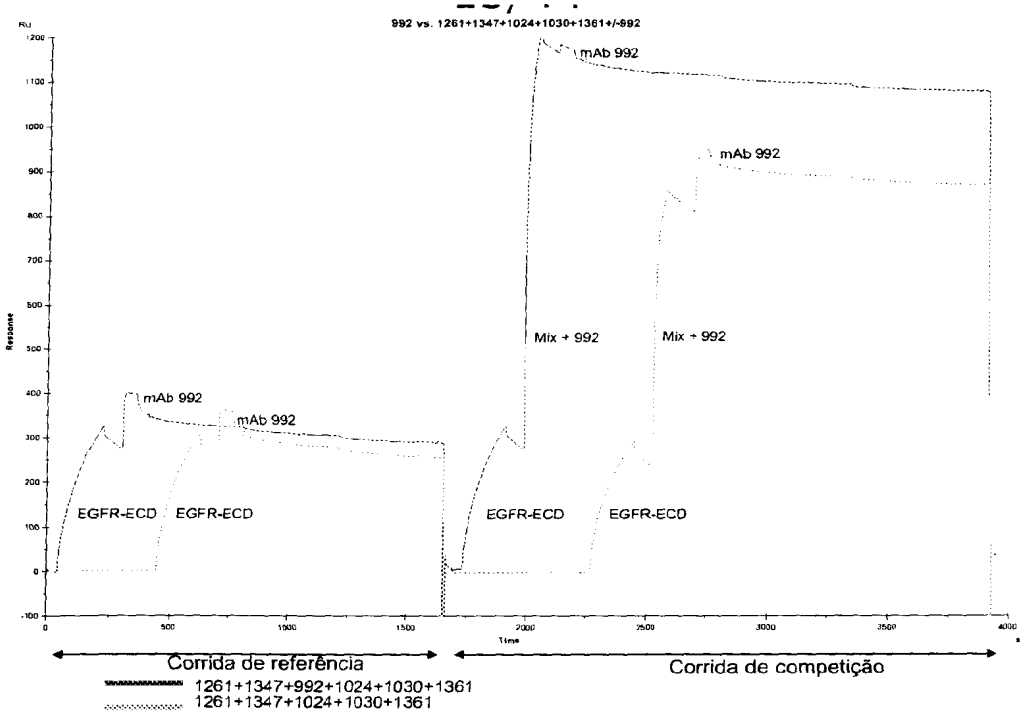


A) 1261 Vs. 1347+992+1024+1030+1361+/-1261

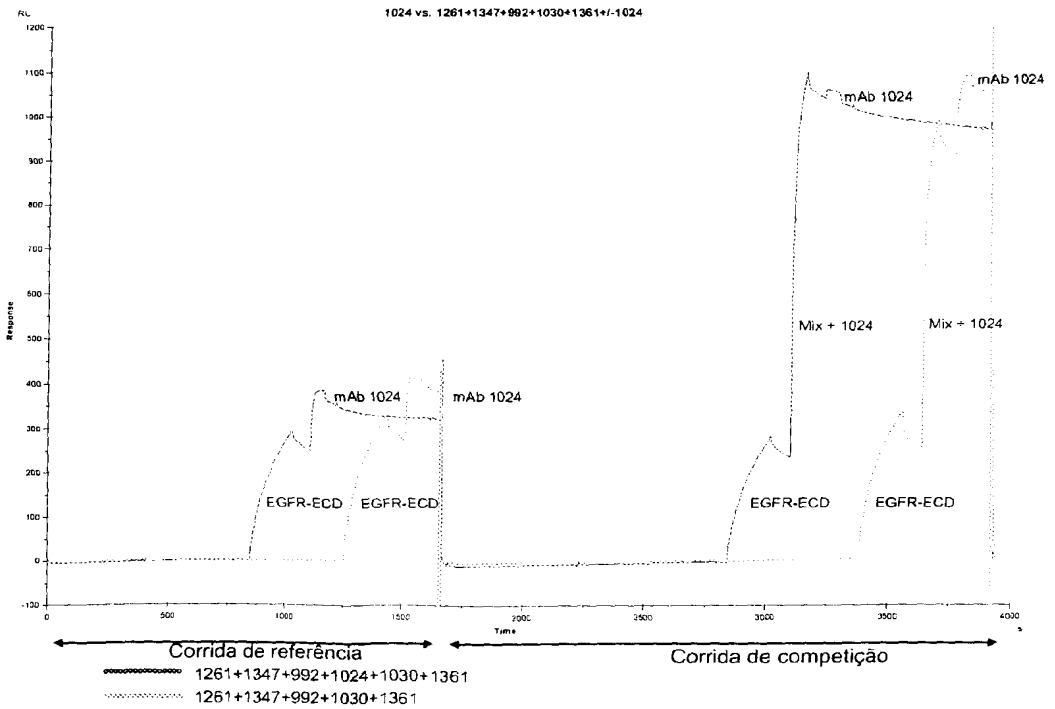


B) 1347 Vs. 1261+992+1024+1030+1361+/-1347

Fig. 11C

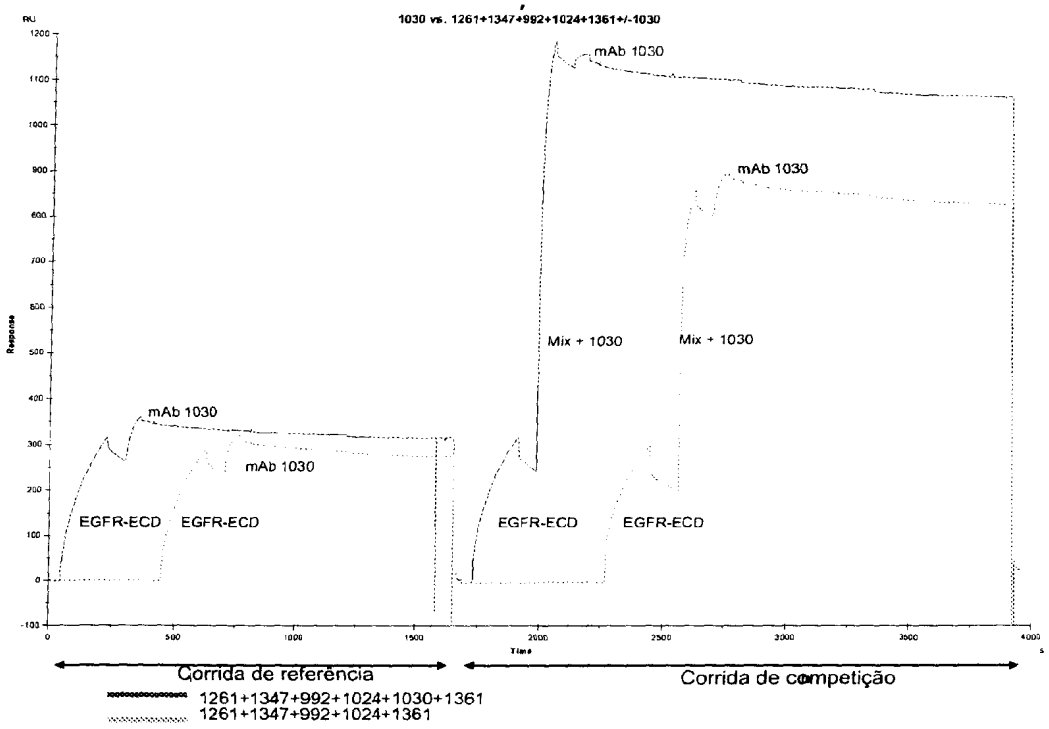


C) 992 Vs. 1261+1347+1024+1030+1361+/-992

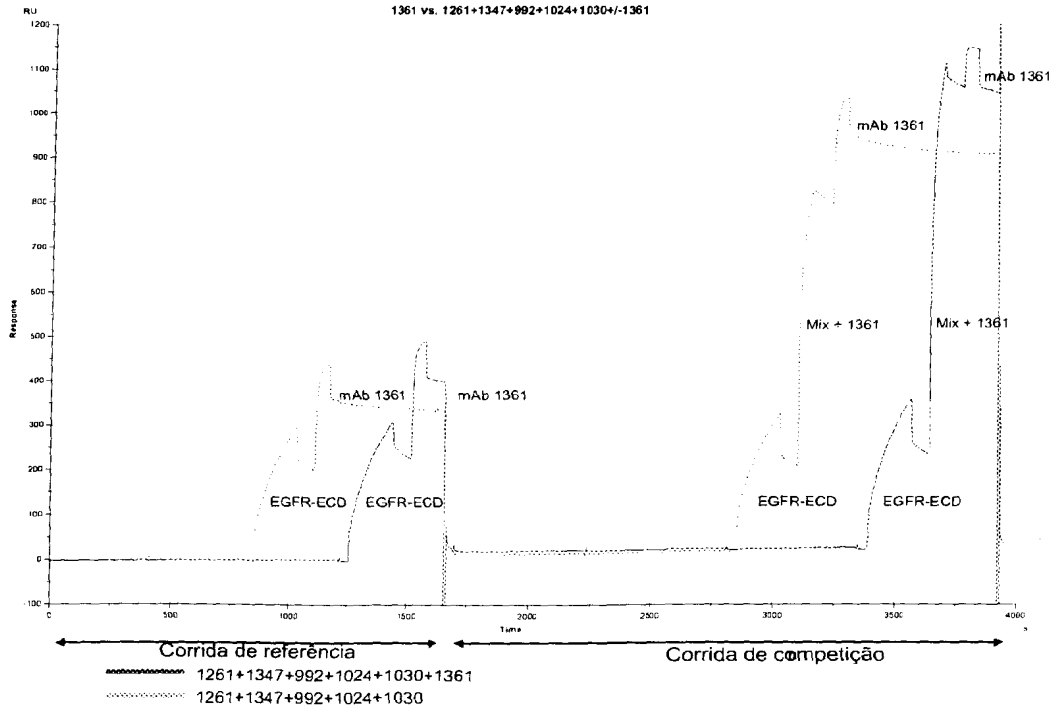


D) 1024 Vs. 1261+1347+992+1030+1361+/-1024

Fig. 11C (Cont.)



E) 1030 Vs. 1261+1347+992+1024+1361+/-1030



F) 1361 Vs. 1261+1347+992+1024+1030+/-1361

Fig. 11C (cont.)

Domínio I **1284**	**1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1284** **75**	68	17
Domínio I/II **1257**	**1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1257** **106**	107	-7*
Domínio Desconhecido **1183**	**1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1183** **112**	56	-7*
Domínio Desconhecido **1255**	**1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1255** **107**	79	-5*

Fig. 11D

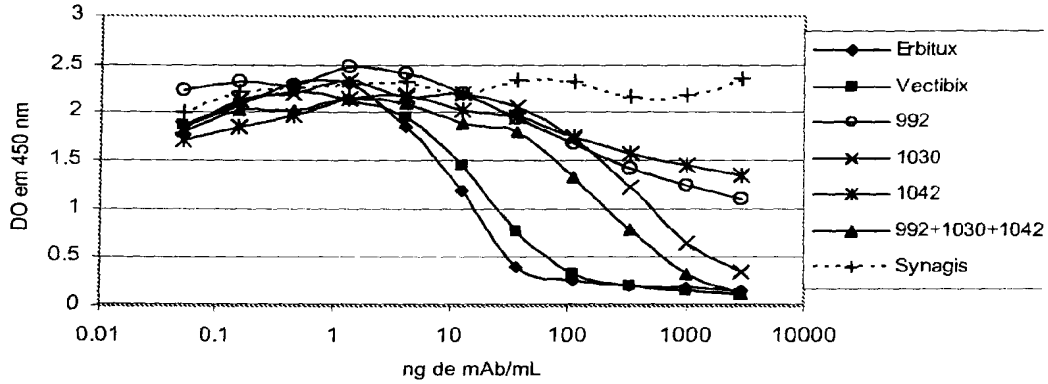


Fig. 12A

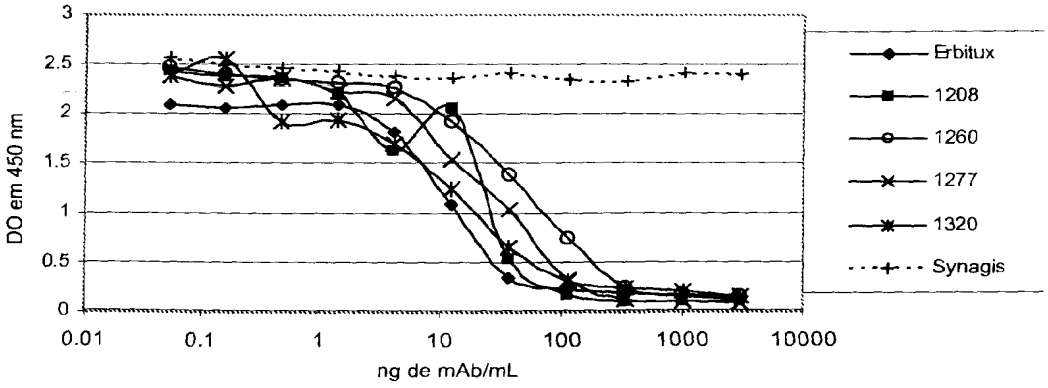


Fig. 12B

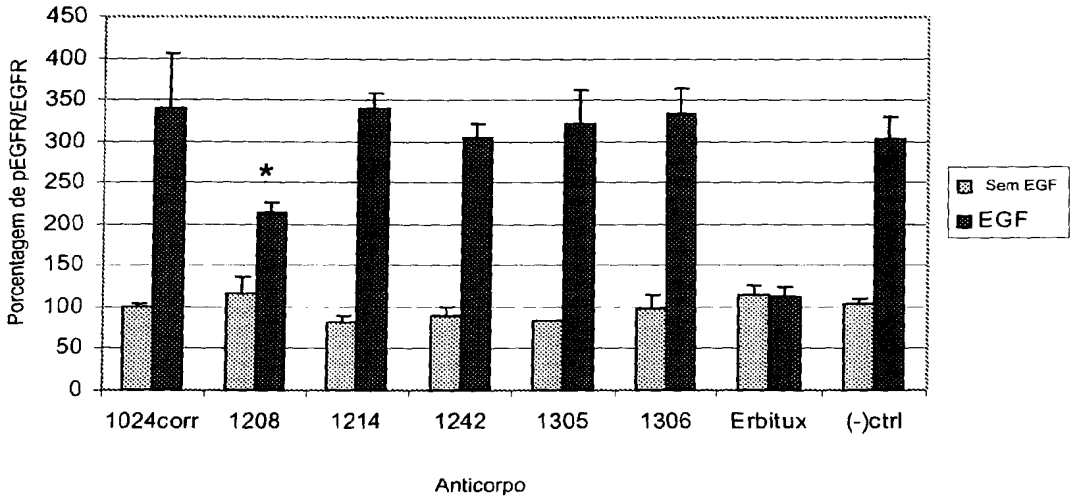


Fig. 13A

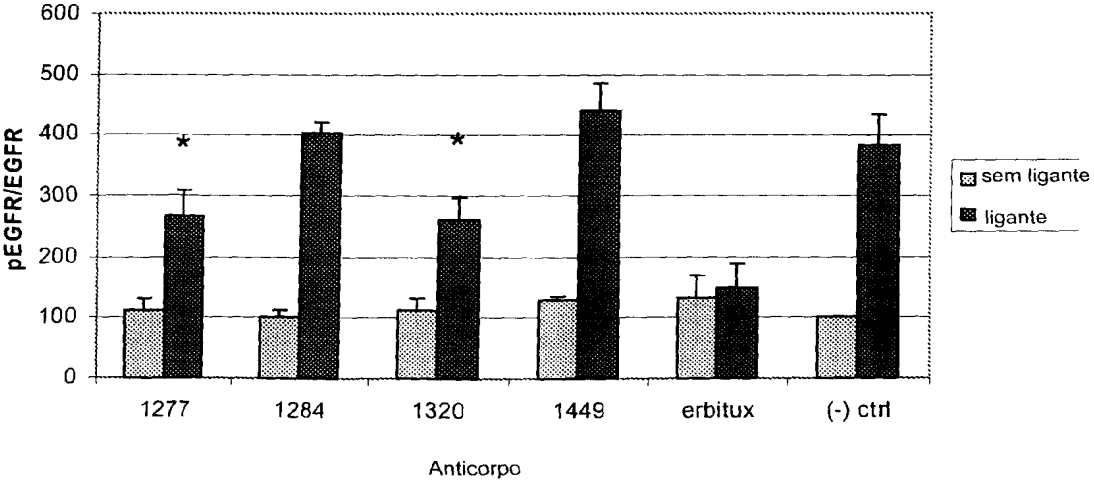


Fig. 13B

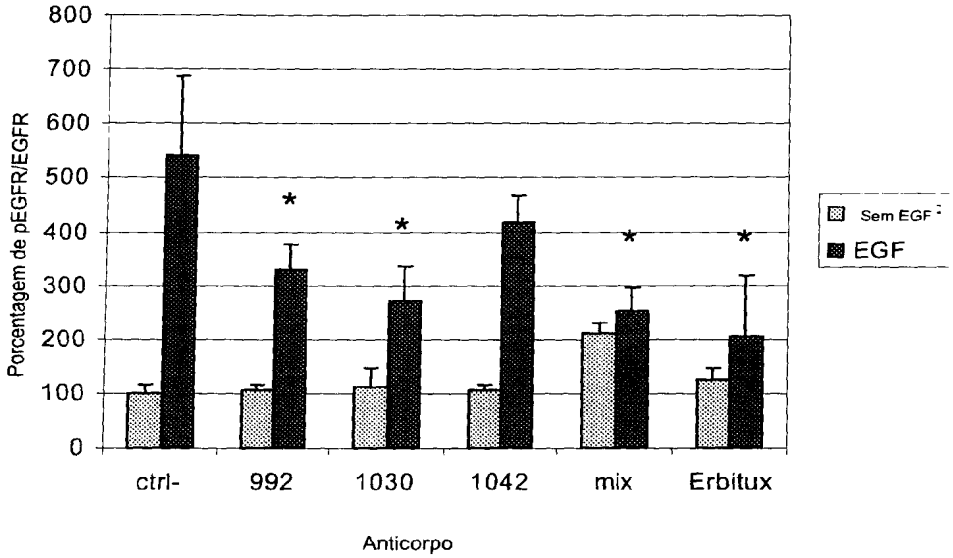

800
700
600
500
400
300
200
100
0
Porcentagem de pEGFR/EGFR
*
*
*
*
Sem EGF
EGF
ctrl-
992
1030
1042
mix
Erbitux
Anticorpo

Fig. 14

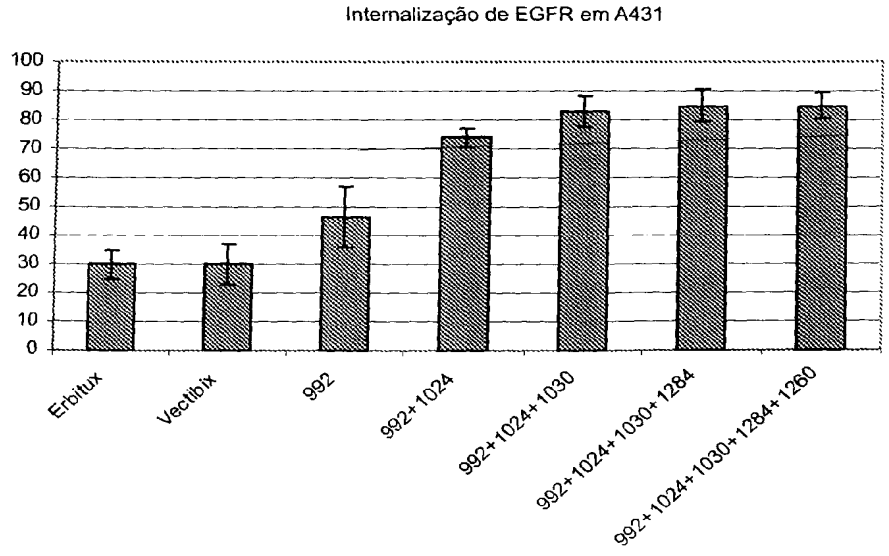

Internalização de EGFR em A431
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Erbitux
Vectibix
992
992+1024
992+1024+1030
992+1024+1030+1284
992+1024+1030+1284+1260

Fig. 15

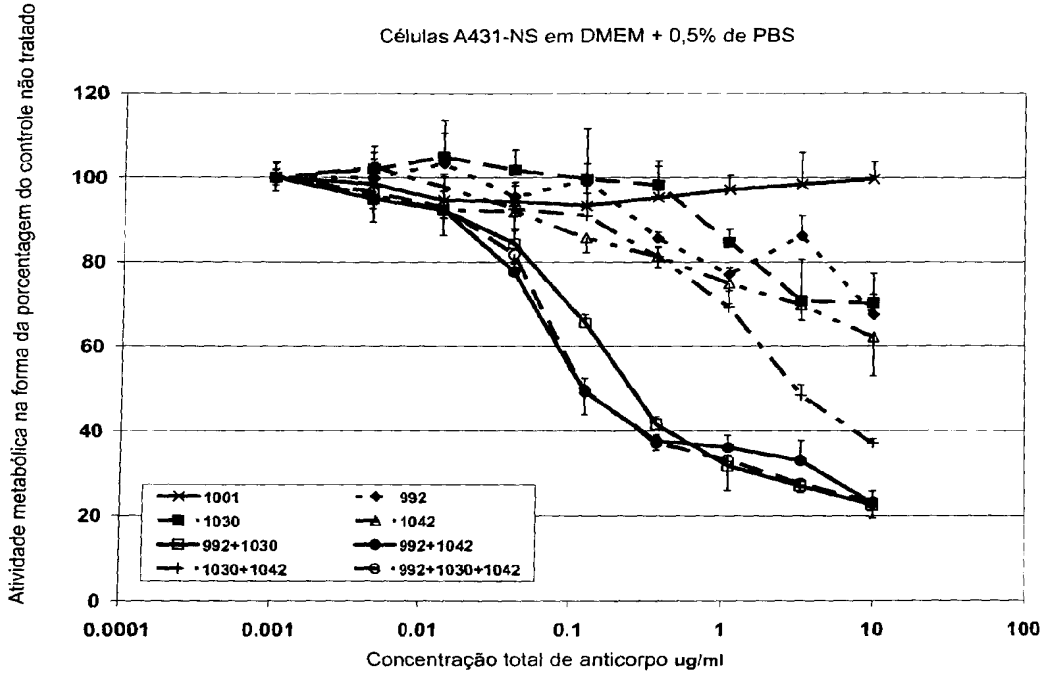

Células A431-NS em DMEM + 0,5% de PBS
Atividade metabólica na forma da porcentagem do controle não tratado
120
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração total de anticorpo ug/ml
1001
992
1030
1042
992+1030
992+1042
1030+1042
992+1030+1042

Fig. 16A

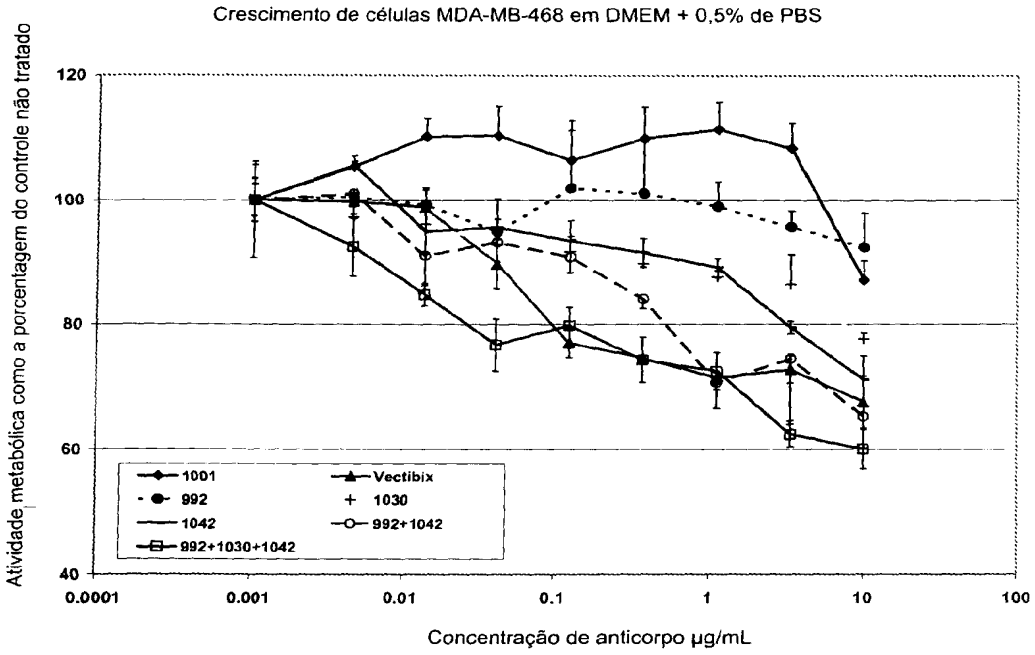


Fig. 16B

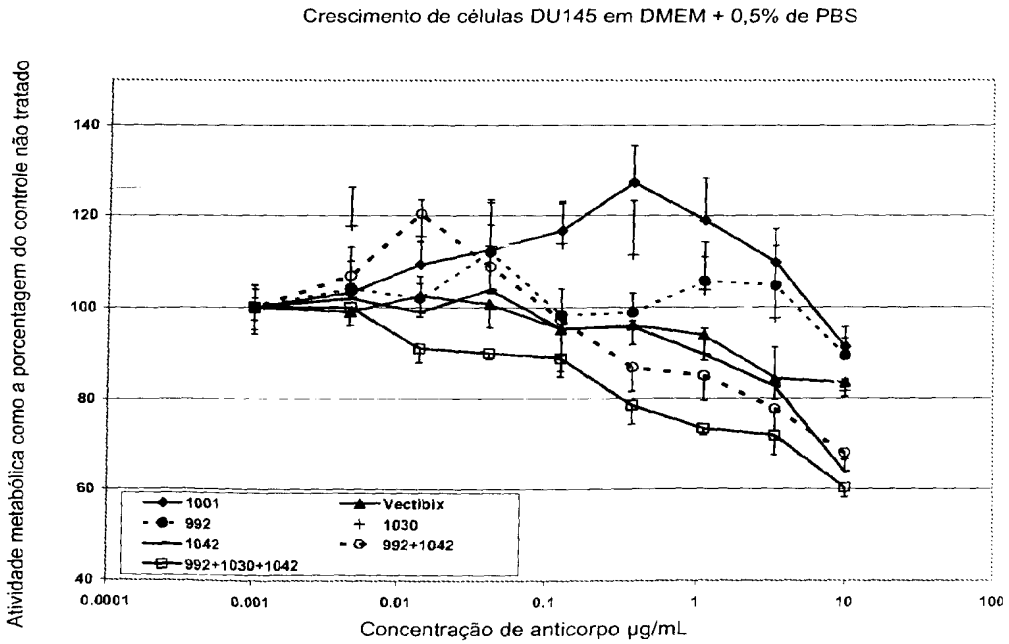


Fig. 16C

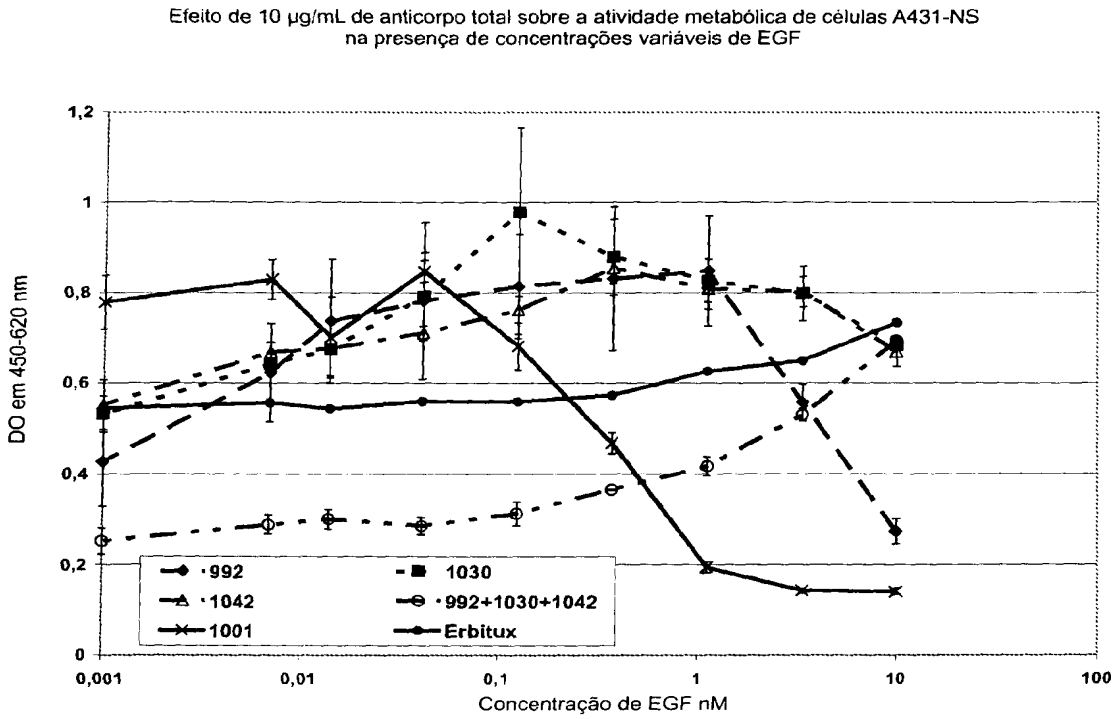

Efeito de 10 µg/mL de anticorpo total sobre a atividade metabólica de células A431-NS
na presença de concentrações variáveis de EGF
DO em 450-620 nm
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentração de EGF nM
992
1030
1042
992+1030+1042
1001
Erbitux

Fig. 17

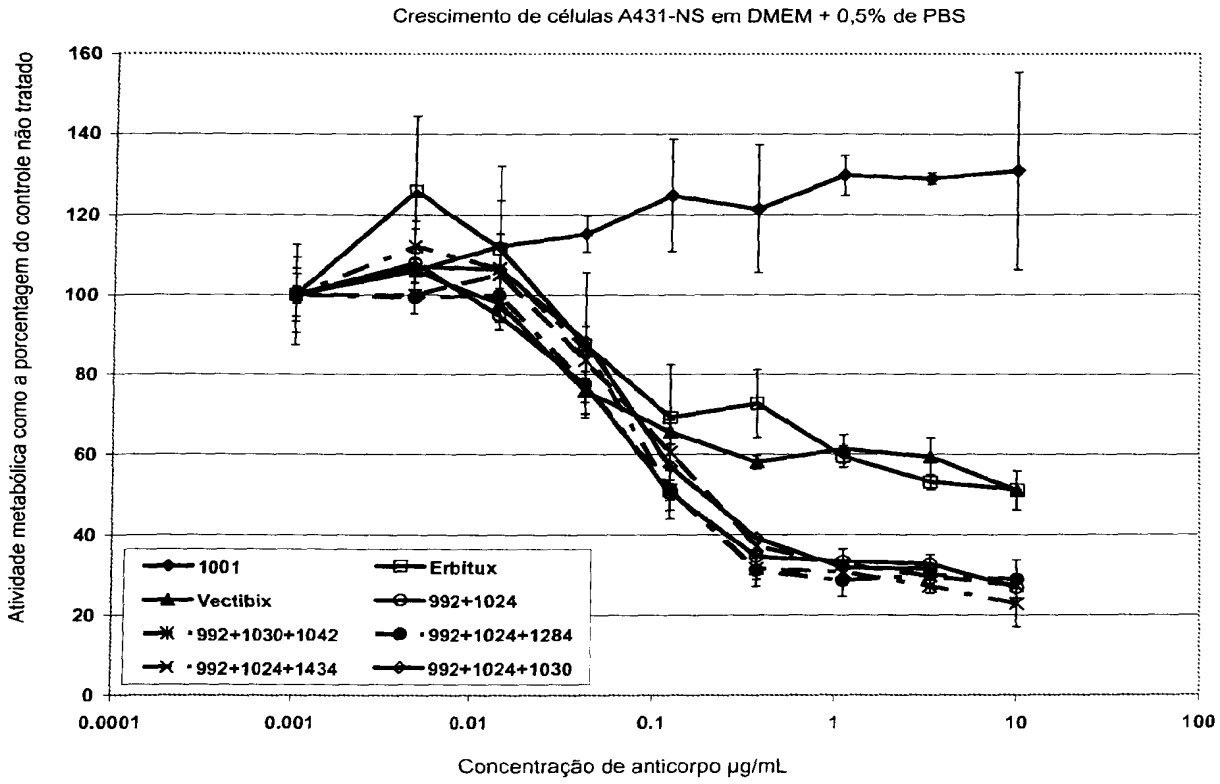

Crescimento de células A431-NS em DMEM + 0,5% de PBS
Atividade metabólica como a porcentagem do controle não tratado
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração de anticorpo µg/mL
1001
Erbitux
Vectibix
992+1024
992+1030+1042
992+1024+1284
992+1024+1434
992+1024+1030

Fig. 18

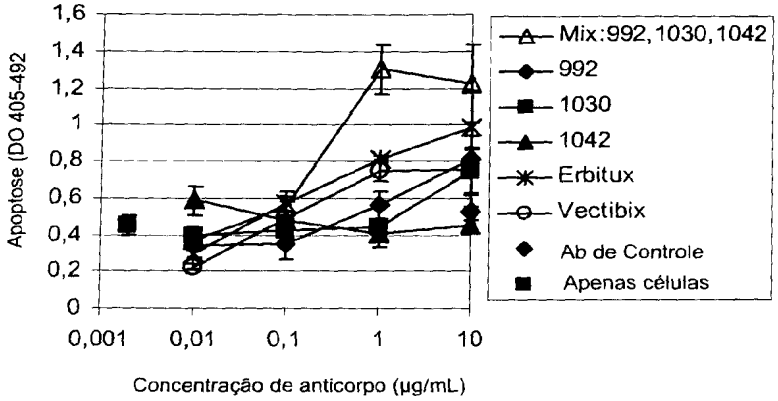

1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Apoptose (DO 405-492
0,001
0,01
0,1
1
10
Concentração de anticorpo (µg/mL)
Mix:992,1030,1042
992
1030
1042
Erbitux
Vectibix
Ab de Controle
Apenas células

Fig. 19

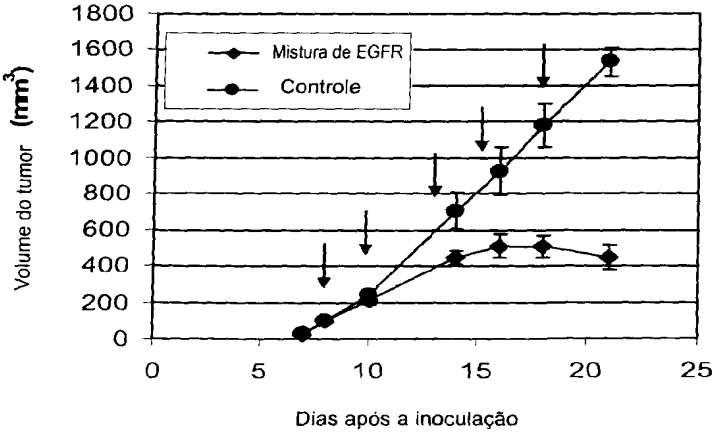

1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Volume do tumor (mm3)
0
5
10
15
20
25
Dias após a inoculação
Mistura de EGFR
Controle

Fig. 20

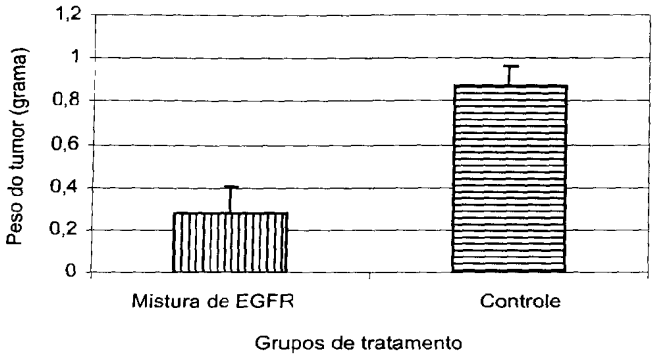

1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Peso do tumor (grama)
Mistura de EGFR
Controle
Grupos de tratamento

Fig.21

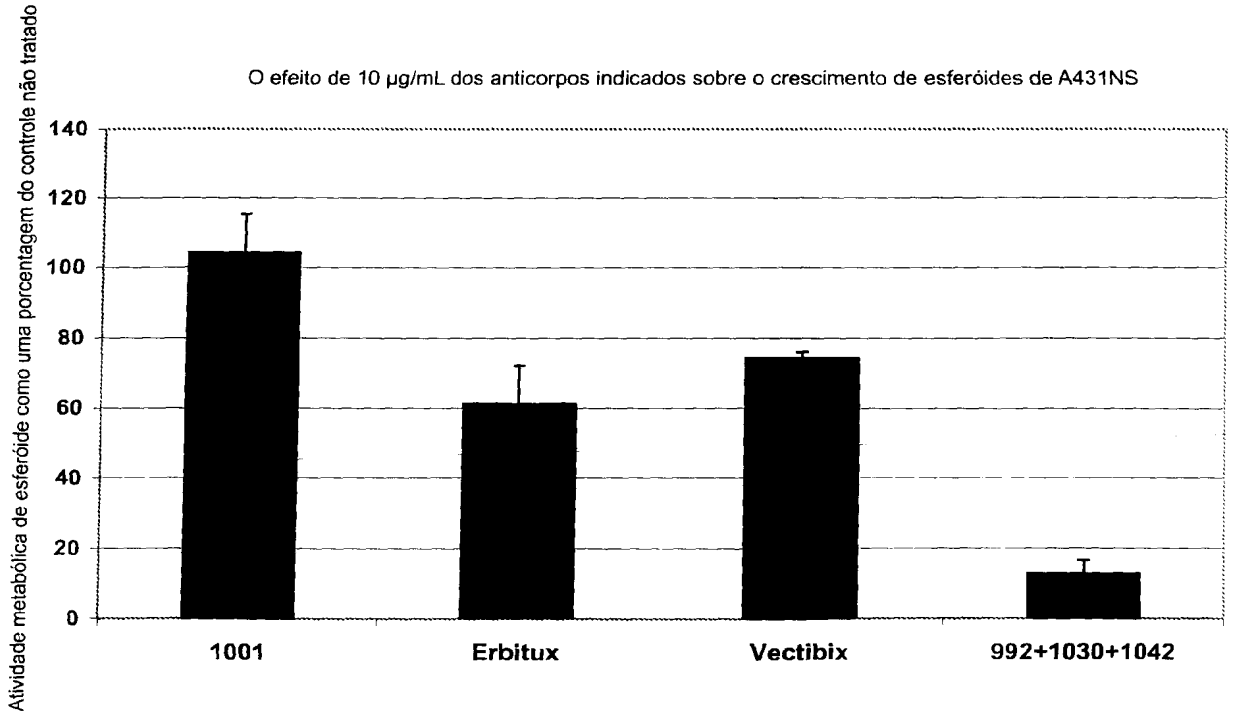

O efeito de 10 µg/mL dos anticorpos indicados sobre o crescimento de esferóides de A431NS
Atividade metabólica de esferóide como uma porcentagem do controle não tratado
140
120
100
80
60
40
20
0
1001
Erbitux
Vectibix
992+1030+1042

Fig. 22

ctggaggaaaagaaagtttgccaaggcacgagtaacaaactcacgcagttgggcactttgaagatcatt
ttctcagcctccagaggatgttcaataactgtgaggtggtccttgggaatttggaaattacctacgtgca
gaggaattatgatctttccttcttaaagaccatccaggaggtggctggttatgtcctcatcgccctcaac
acagtggagcggattcctttggaaaacctgcagatcatcagaggaaacatgtactatgaaaattcctatg
ccttagcagtcttatctaactatgatgcaaataaaaccggactgaaggagctgcccatgagaaacttaca
ggaaatcctgcatggcgccgtgcggttcagcaacaaccctgccctgtgcaacgtggagagcatccagtgg
cgggacatagtcagcagcgagtttctcagcaacatgtcgatggacttccagaaccacctgggcagctgcc
aaaagtgtgatccaagctgtcccaatgggagctgctggggtgcaggagaggagaactgccagaaactgac
caaaatcatctgtgcccagcagtgctccgggcgctgccgcggcaagtcccccagtgactgctgccacaac
cagtgtgccgcgggctgcacgggcccccgggagagcgactgcctggtctgccgcaaattccgagacgaag
ccacgtgcaaggacacctgcccccactcatgctctacaaccccaccacataccagatggatgtgaaccc
cgagggcaaatacagctttggtgccacctgcgtgaagaagtgtccccgtaattatgtggtgacagatcac
ggctcgtgcgtccgagcctgcggggccgacagctatgagatggaggaagacggcgtccgcaagtgtaaga
agtgcgaagggccttgccgcaaagtgtgtaatggaataggtattggtgaatttaaagacacactctccat
aaatgctacaaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcctgccggtg
gcatttaggggtgactccttcacacacactccgcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccg
taaaggaaatcacagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcttttga
gaacctagaaatcatacgtggcaggaccaagcaacacggtcagttttctcttgcggtcgtcagcctgaac
ataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagcgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaa
atttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccagtcagaaaaccaaaattat
aagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacgggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggc
tgctggggcccggagcccagggactgcgtctcctgccagaatgtcagccgaggcagagaatgcgtggaca
agtgcaacatcctggagggcgagccaagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccaga
atgcctgccccaggtcatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatccagtgtgcccac
tacattgacggcccccactgcgtcaagacctgcccagcaggagtcatgggagaaaacaacaccctggtct
ggaagtacgcagacgccggccacgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggcc
aggtcttgaaggctgtgcaaggaacgggcctaagatcccatcc

Fig. 23A

LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALN
TVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQW
RDIVSSEFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHN
QCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDH
GSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPV
AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN
ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEG
CWGPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCNILEGEPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAH
YIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCARNGPKIPS

Fig. 23B

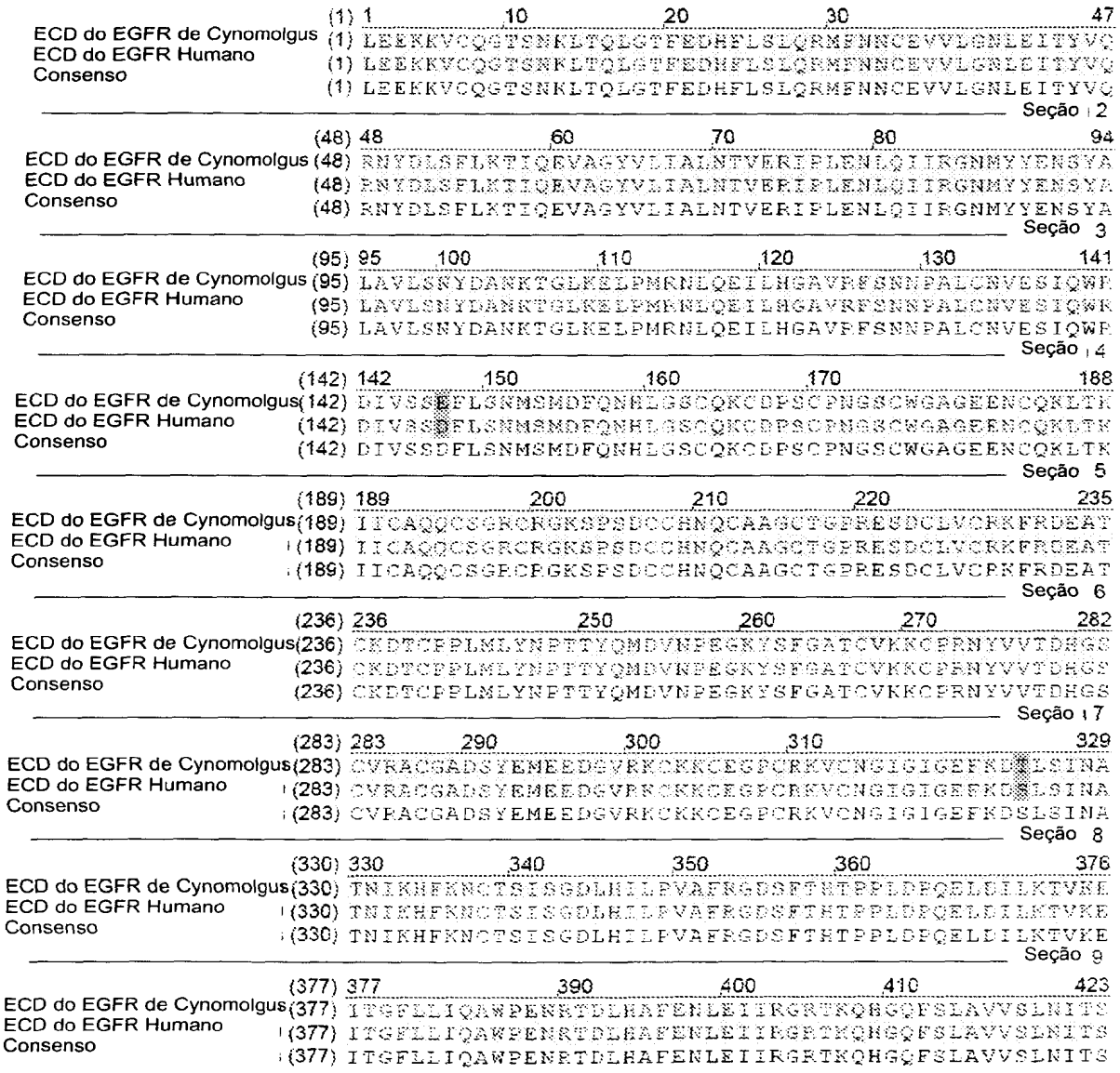

ECD do EGFR de Cynomolgus
ECD do EGFR Humano
Consenso
Seção 2
Seção 3
Seção 4
Seção 5
Seção 6
Seção 7
Seção 8
Seção 9

Fig.24

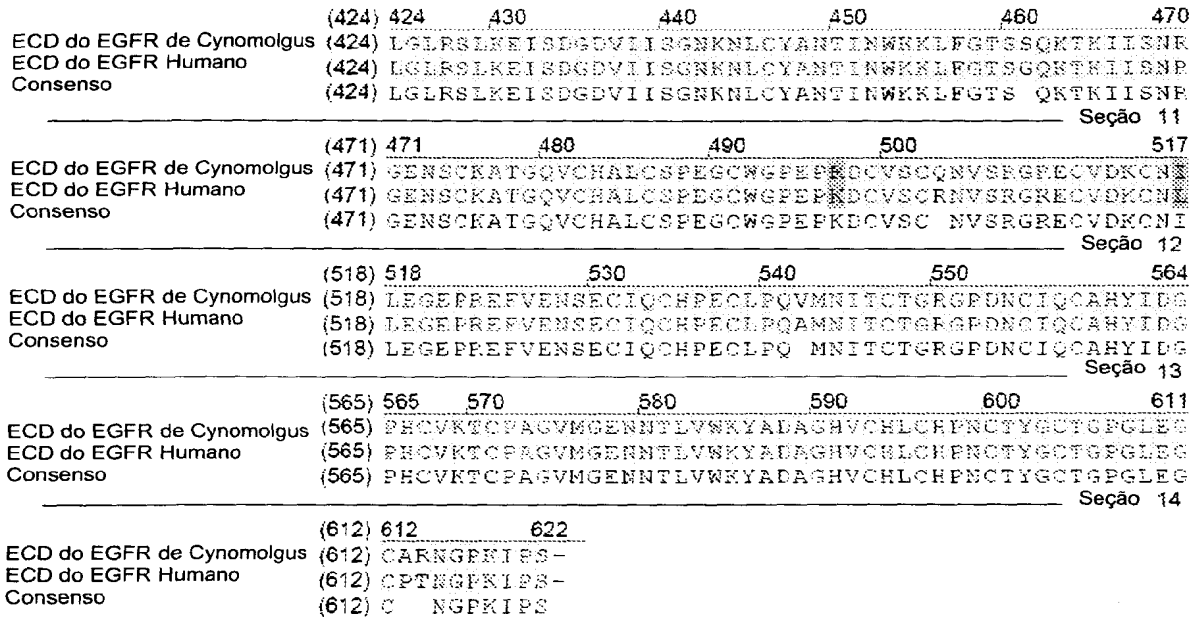

(424) 424 430 440 450 460 470
ECD do EGFR de Cynomolgus (424) LGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR
ECD do EGFR Humano (424) LGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQNTKIISNR
Consenso (424) LGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTS QKTKIISNR
Seção 11
(471) 471 480 490 500 517
ECD do EGFR de Cynomolgus (471) GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCN
ECD do EGFR Humano (471) GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPKDCVSCRNVSRGRECVDKCN
Consenso (471) GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPKDCVSC NVSRGRECVDKCNI
Seção 12
(518) 518 530 540 550 564
ECD do EGFR de Cynomolgus (518) LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG
ECD do EGFR Humano (518) LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG
Consenso (518) LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQ MNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG
Seção 13
(565) 565 570 580 590 600 611
ECD do EGFR de Cynomolgus (565) PHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG
ECD do EGFR Humano (565) PHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG
Consenso (565) PHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG
Seção 14
(612) 612 622
ECD do EGFR de Cynomolgus (612) CARNGPKIPS-
ECD do EGFR Humano (612) CPTNGPKIPS-
Consenso (612) C NGPKIPS

Fig.24 (Cont.)

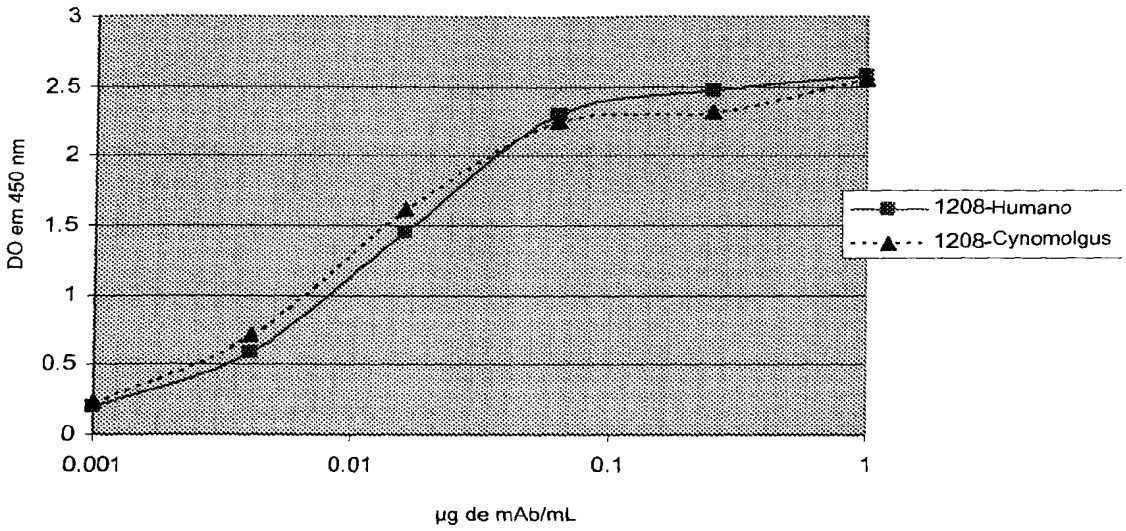


Fig. 25 A

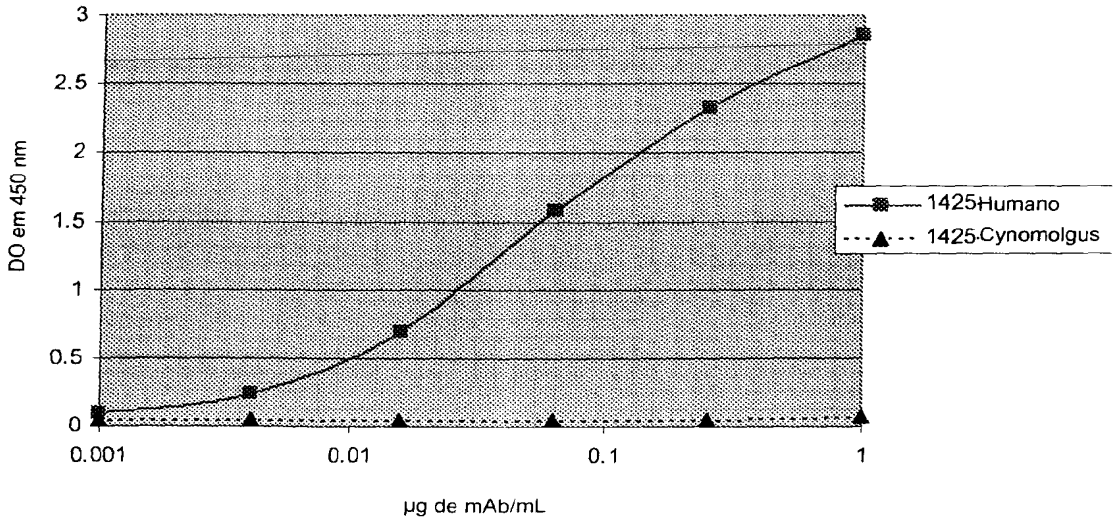


Fig. 25 B

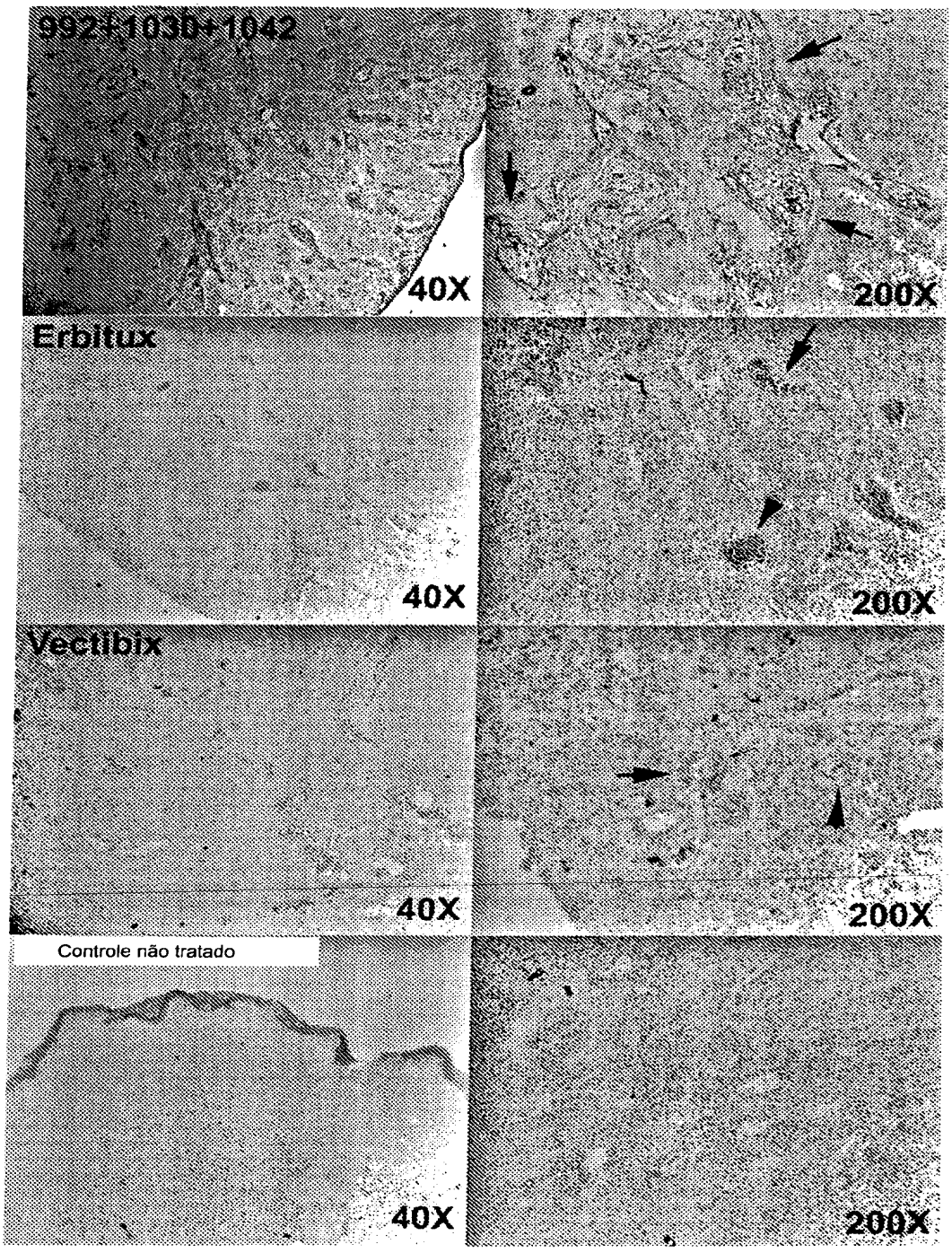

992+1030+1042
40X
200X
Erbitux
40X
200X
Vectibix
40X
200X
Controle não tratado
40X
200X

Fig. 26

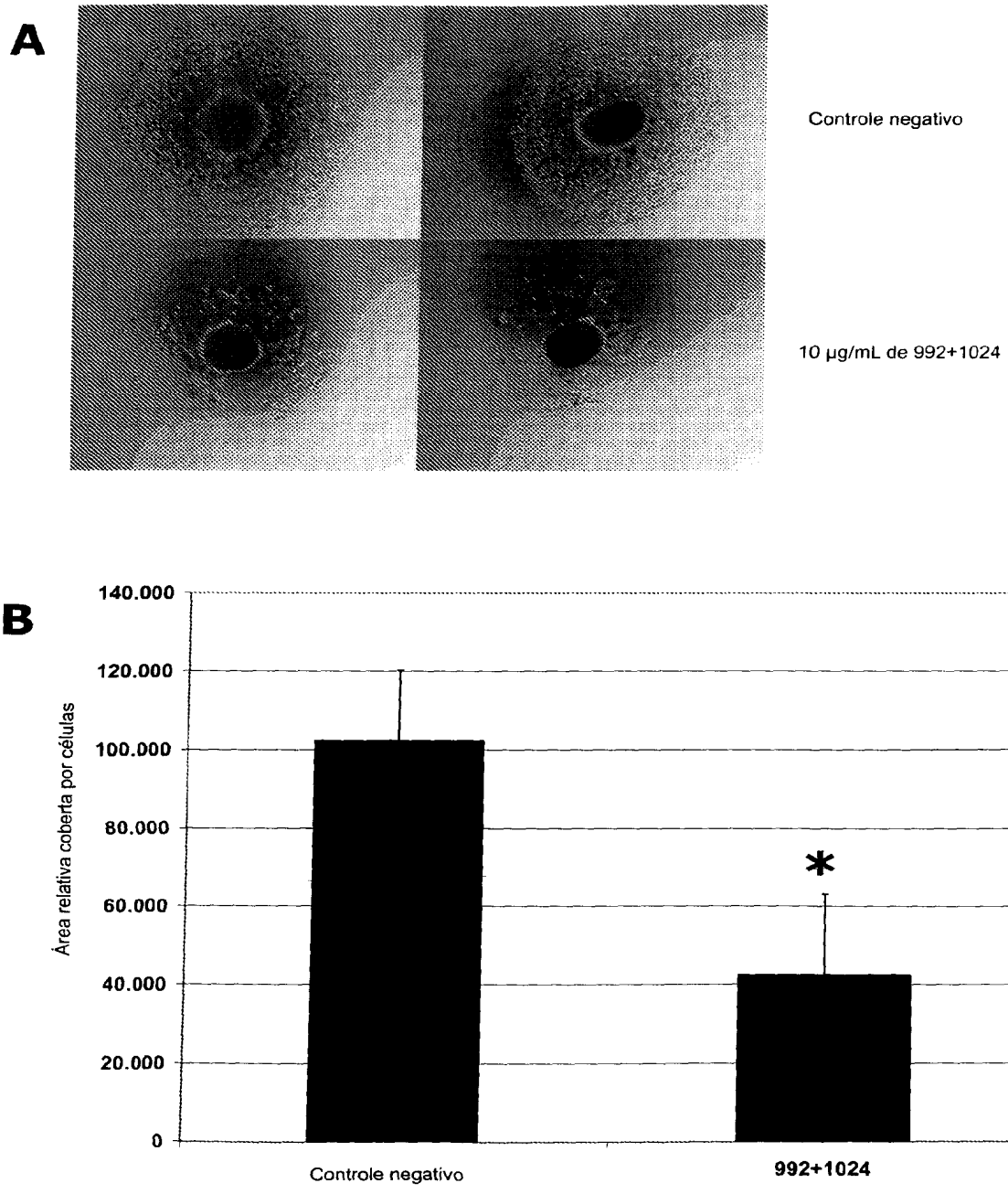

A
Controle negativo
10 µg/mL de 992+1024
B
140.000
120.000
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
Área relativa coberta por células
*
Controle negativo
992+1024

Fig. 27

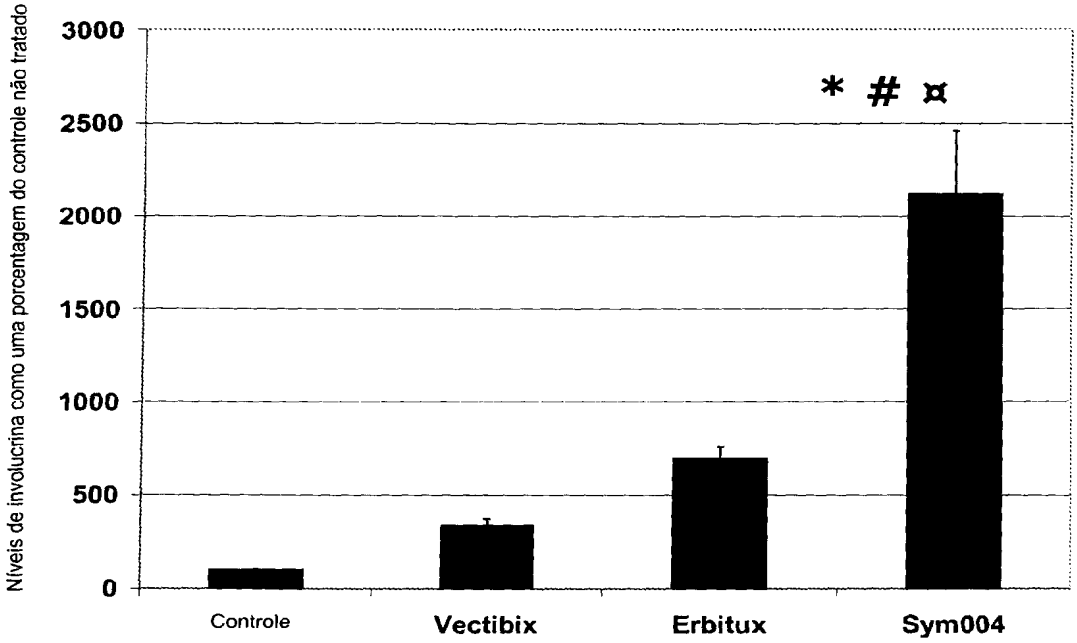

Níveis de involucrina como uma porcentagem do controle não tratado
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
* # ¤
Controle
Vectibix
Erbitux
Sym004

Fig. 28

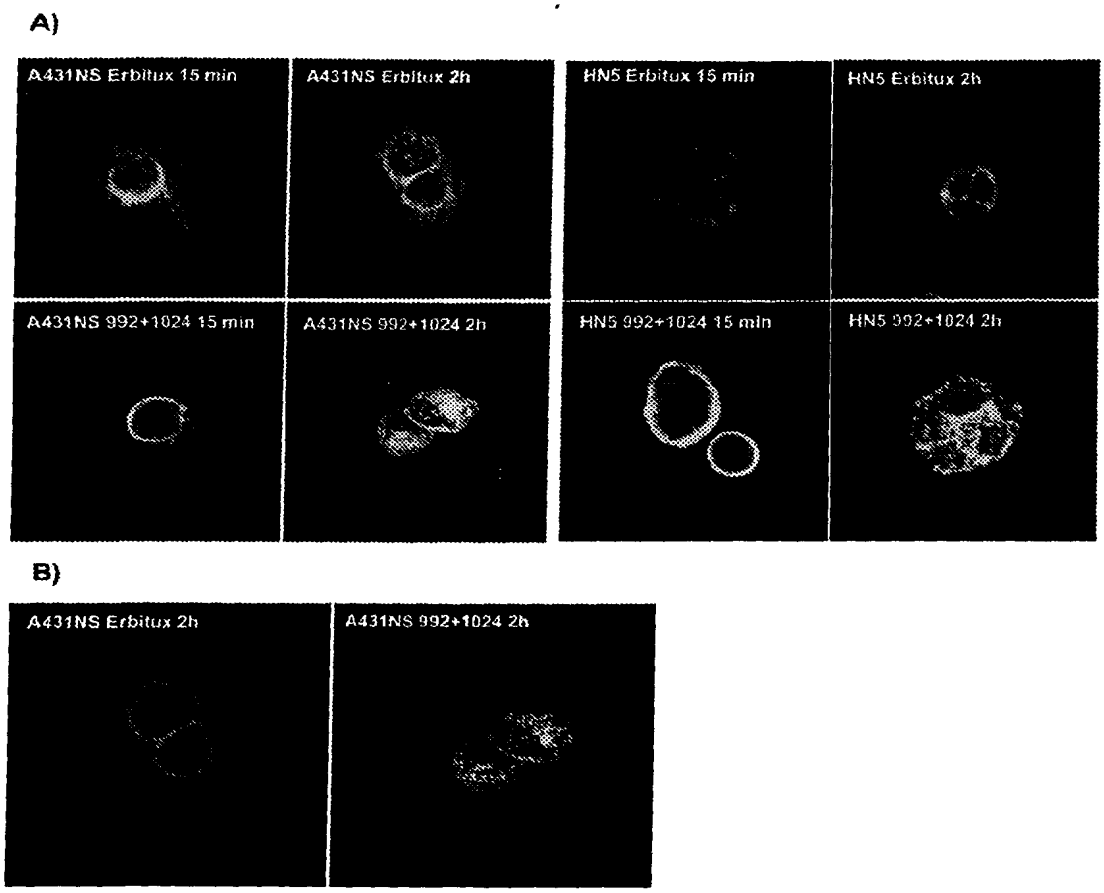

A)
A431NS Erbitux 15 min
A431NS Erbitux 2h
HN5 Erbitux 15 min
HN5 Erbitux 2h
A431NS 992+1024 15 min
A431NS 992+1024 2h
HN5 992+1024 15 min
HN5 992+1024 2h
B)
A431NS Erbitux 2h
A431NS 992+1024 2h

Fig. 29

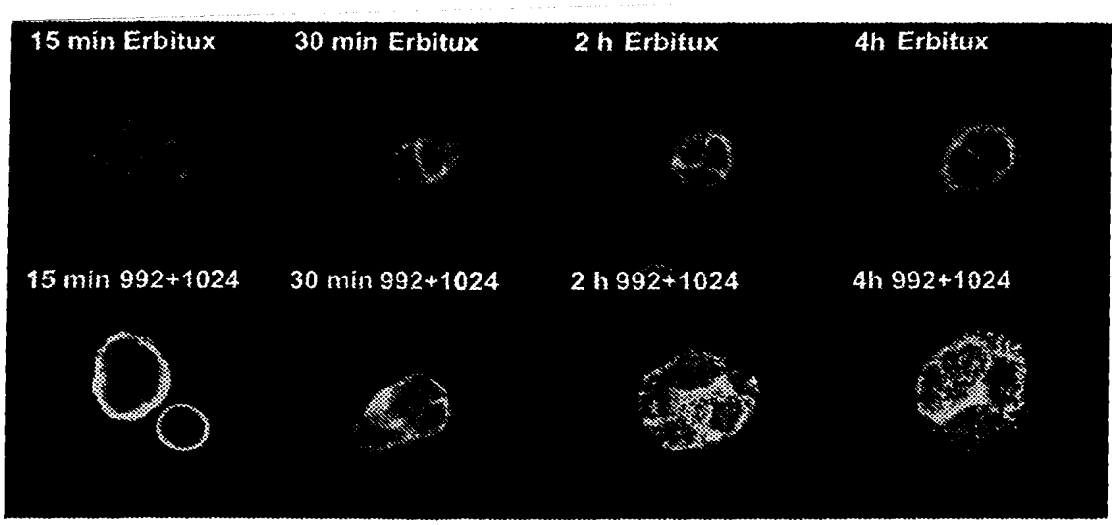

15 min Erbitux
30 min Erbitux
2 h Erbitux
4h Erbitux
15 min 992+1024
30 min 992+1024
2 h 992+1024
4h 992+1024

Fig. 30

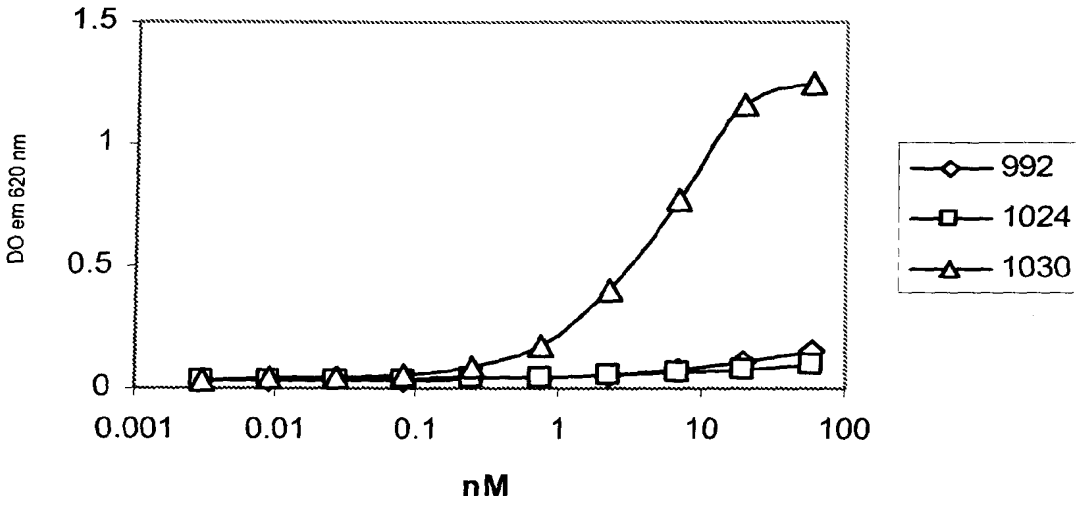


Fig. 31A

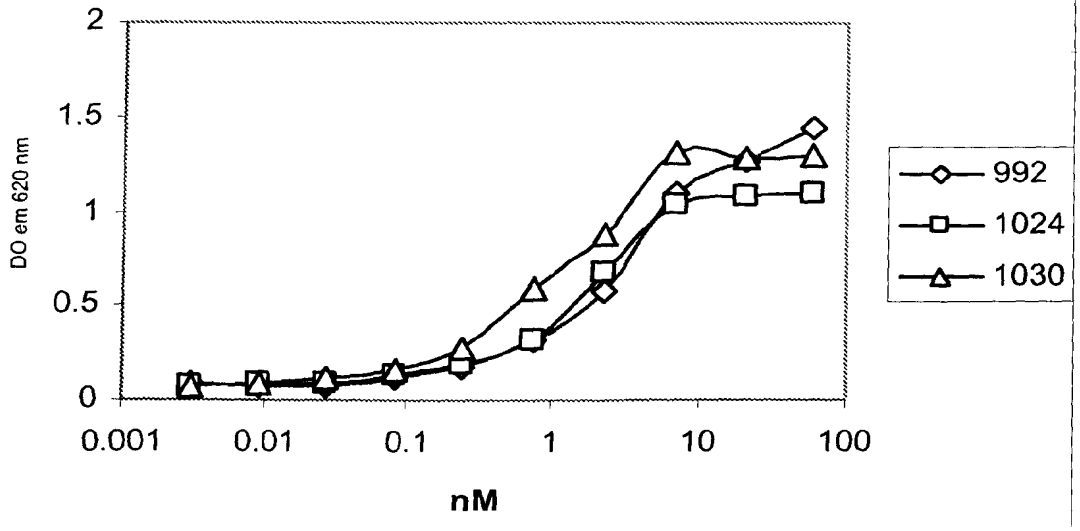


Fig. 31B

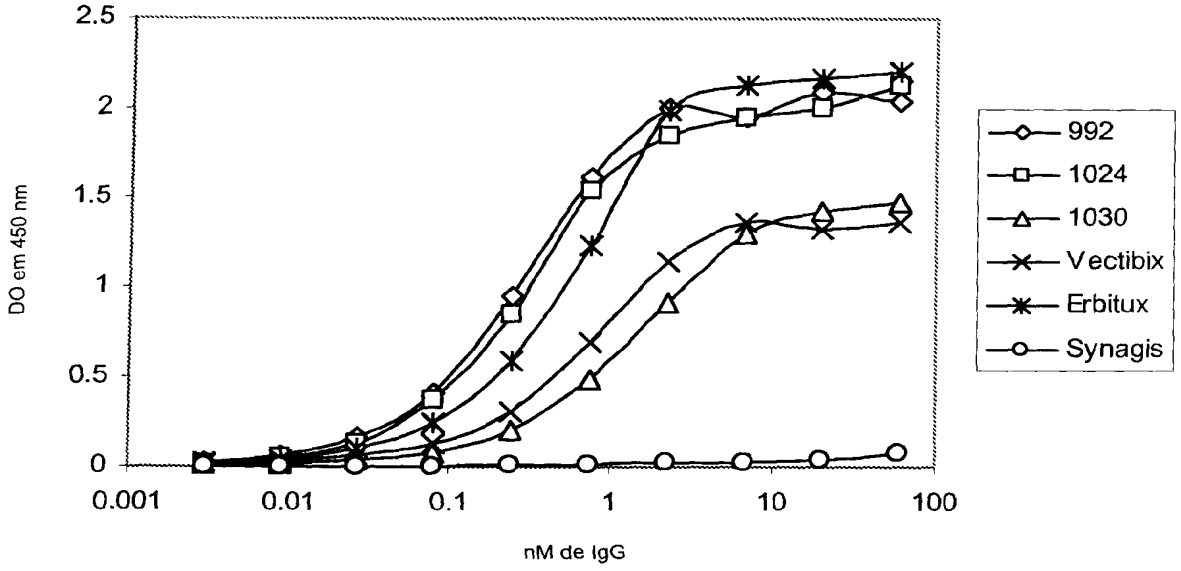


Fig. 32A

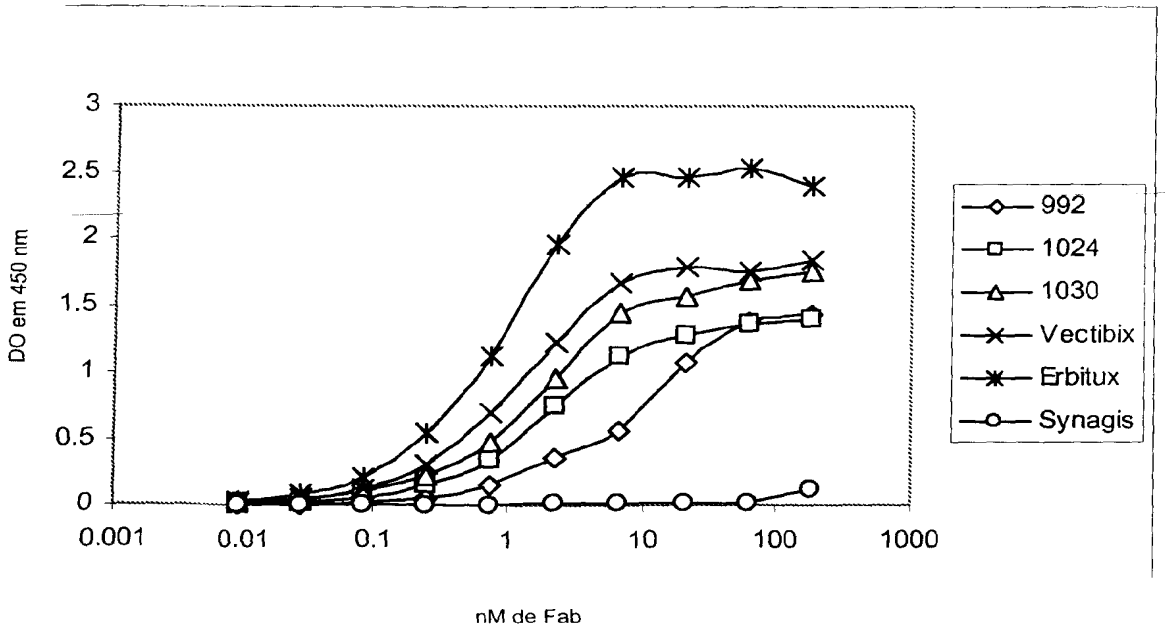


Fig. 32B

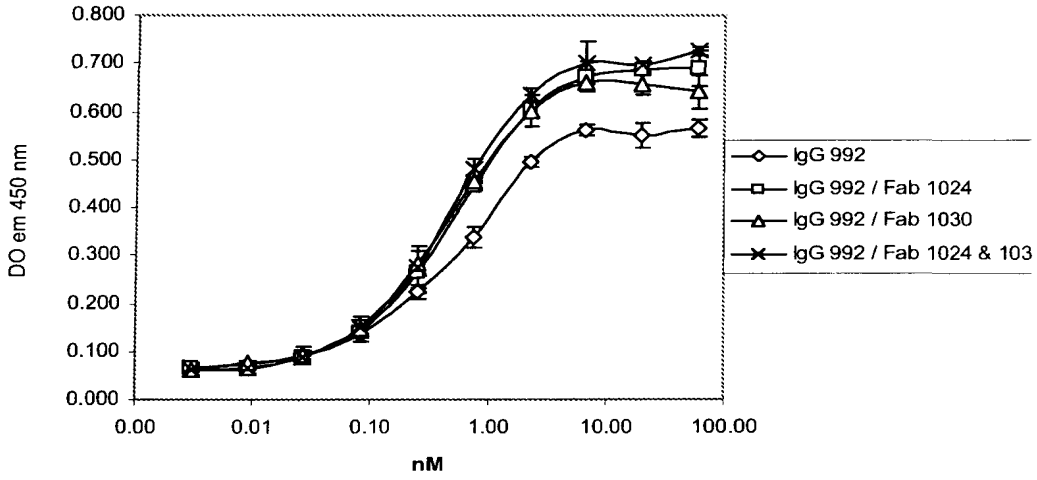


Fig. 33A

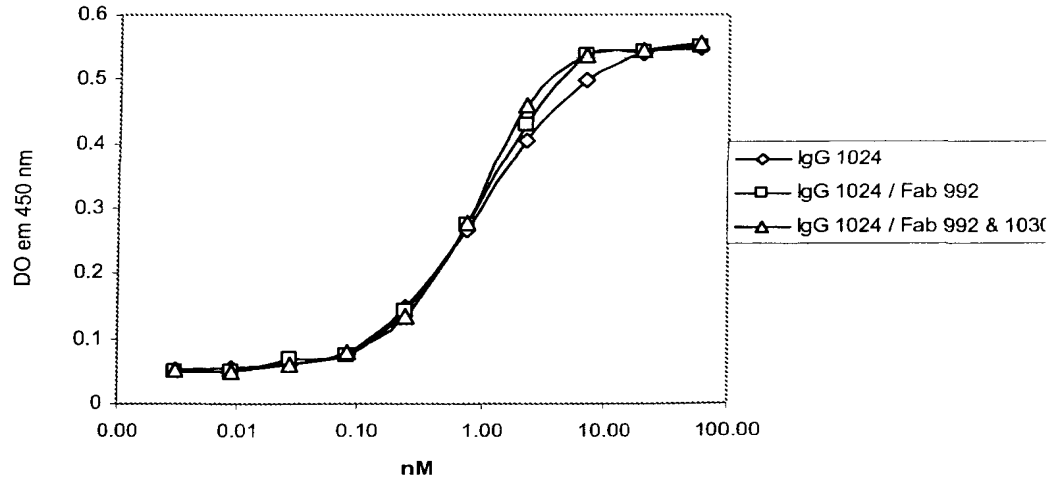


Fig. 33B

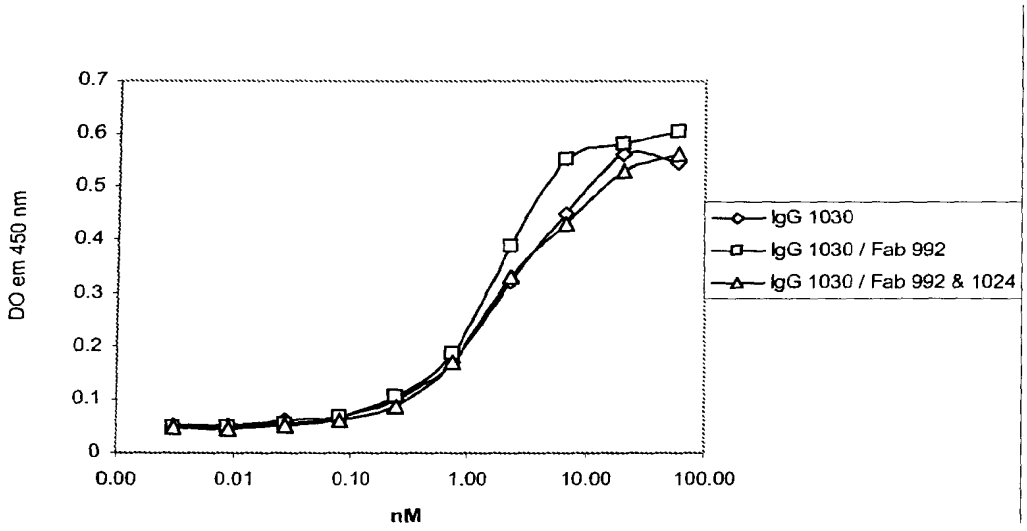

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
DO em 450 nm
0.00
0.01
0.10
1.00
10.00
100.00
nM
IgG 1030
IgG 1030 / Fab 992
IgG 1030 / Fab 992 & 1024

Fig. 33C

atgcgaccctccgggacggccggggccgcgctcctggcgctgctggctgcgctttgccccgcgagtcgggctctggaggaaaa
gaaagtttgccaaggcacgagtaacaaactcacgcagttgggcacttttgaagatcattttctcagcctccagaggatgttca
ataactgtgaggtggtccttgggaatttggaaattacctacgtgcagaggaattatgatctttccttcttaaagaccatccag
gaggtggctggttatgtcctcatcgccctcaacacagtggagcggattcctttggaaaacctgcagatcatcagaggaaacat
gtactatgaaaattcctatgccttagcagtcttatctaactatgatgcaaataaaaccggactgaaggagctgcccatgagaa
acttacaggaaatcctgcatggcgccgtgcggttcagcaacaaccctgccctgtgcaacgtggagagcatccagtggcgggac
atagtcagcagcgagtttctcagcaacatgtcgatggacttccagaaccacctgggcagctgccaaaagtgtgatccaagctg
tcccaatgggagctgctggggtgcaggagaggagaactgccagaaactgaccaaaatcatctgtgcccagcagtgctccgggc
gctgccgcggcaagtcccccagtgactgctgccacaaccagtgtgccgcgggctgcacgggcccccgggagagcgactgcctg
gtctgccgcaaattccgagacgaagccacgtgcaaggacacctgccccccactcatgctctacaaccccaccacataccagat
ggatgtgaaccccgagggcaaatacagctttggtgccacctgcgtgaagaagtgtccccgtaattatgtggtgacagatcacg
gctcgtgcgtccgagcctgcggggccgacagctatgagatggaggaagacggcgtccgcaagtgtaagaagtgcgaagggcct
tgccgcaaagtgtgtaatggaataggtattggtgaatttaaagacacactctccataaatgctacaaatattaaacacttcaa
aaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacacactccgcctctgg
atccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacg
gacctccatgcttttgagaacctagaaatcatacgtggcaggaccaagcaacacggtcagttttctcttgcggtcgtcagcct
gaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagcgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgct
atgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccagtcagaaaaccaaaattataagcaacagaggtgaaaacagc
tgcaaggccacgggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggctgctggggcccggagcccagggactgcgtctcctg
tcagaatgtcagccgaggcagagaatgcgtggacaagtgcaacatcctggagggcgagccaagggagtttgtggagaactctg
agtgcatacagtgtcacccagaatgcctgccccaggtcatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatccag
tgtgcccactacattgacggcccccactgcgtcaagacctgcccagcaggagtcatgggagaaaacaacaccctggtctggaa
gtacgcagacgccggccacgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggccaggtcttgaaggctgtg
caaggaacgggcctaagatcccatccatcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtggccctggggatc
ggcctcttcatgcgaaggcgccacatcgttcggaagcgcacactgcggaggctgctgcaggagagggagcttgtggagcctct
tacgcccagtggagaagctcccaaccaagctctcttgaggatcttgaaggaaactgaattcaagaagatcaaagtgctgggct
ccggtgcgttcggaactgtgtataagggactctggatcccagaaggtgagaaagttaaaattcccgtcgctatcaaggaatta
agagaagcaacatctccgaaagccaacaaggaaatcctcgatgaagcctacgtgatggccagcgtggacaacccccatgtgtg
ccgcctgctgggcatctgcctcacctccaccgtgcagctcattacgcagctcatgcccttcggctgcctcctggactacgtcc
gggaacacaaggacaatatcggctcccagtacctgctcaactggtgtgtgcagattgcaaagggcatgaactacttggaggac
cggcgcttggtgcaccgcgacctggcagccaggaacgtactggtgaaaacgccacagcatgtcaagatcacagattttgggct
ggccaaactgctgggtgcagaagagaaagaataccatgcagaaggaggcaaagtgcctatcaagtggatggcgttggaatcaa
ttttacaccgaatttatacccaccagagtgatgtctggagctacggggtgaccgtttgggagttgatgacctttggatccaag
ccatatgacggaatccctgccagcgagatctcctccatcctggagaaaggagaacgcctcccccagccacccatatgtaccat
cgatgtctacatgatcatggtcaagtgctggatgatagacgcagatagtcgcccaaagttccgtgagttgatcattgaattct
ccaaaatggcccgagacccccagcgctaccttgttattcaggggggatgaaagaatgcatttgccaagccctacagactccaac
ttctaccgtgccctgatggatgaagaagacatggacgacgtggtggatgccgacgagtacctcatcccacagcaaggcttctt
cagcagcccctccacgtcacggactcccctcctgagctctctgagtgcaactagcaacaattccactgtggcttgcattgata

Fig. 34A

gaaatgggctgcaaagctgttccatcaaggaagacagcttcttacagcgatacagctcagaccccacaggcgccttgactgag
gacagcatagacgacaccttcctcccagtgcctgaatacataaaccagtctgttcccaaaaggcccgctggctctgtgcagaa
tcctgtctatcacaatcagcctctgaaccctgcgcccagcagagacccacactaccaggacccccacagcaccgcagtgggca
accccgagtatctcaacactgtccagcccacctgtgtcaacagcacattcgacagccctgctcattgggcccagaaaggcagc
caccaaattagcctggacaaccctgactaccagcaggacttctttcccaaggaagccaagccaaatggcatctttaagggctc
cacagctgaaaatgcagaatacctaagggtcgcaccacaaagcagtgaatttattggagcatga

Fig. 34A (Cont.)

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEV
VLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALA
VLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSEFLSNMSMDF
QNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGC
TGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYV
VTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFK
NCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAF
ENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKL
FGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCN
ILEGEPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCARNGPKIPSIATGMVGALLLLLVV
ALGIGLFMRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGS
GAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGI
CLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAA
RNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSY
GVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPK
FRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLIPQ
QGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNGLQSCSIKEDSFLQRYSSDPTGALTED
SIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLN
TVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRV
APQSSEFIGA

Fig. 34B

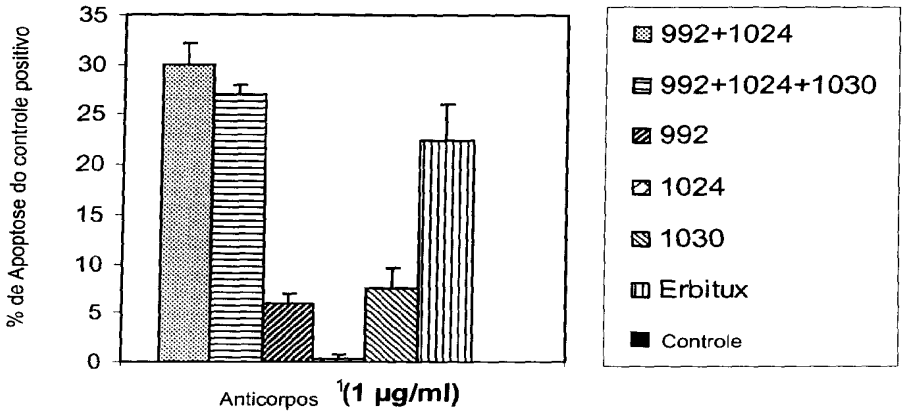

% de Apoptose do controle positivo
35
30
25
20
15
10
5
0
Anticorpos [1](1 µg/ml)
992+1024
992+1024+1030
992
1024
1030
Erbitux
Controle

Fig. 35

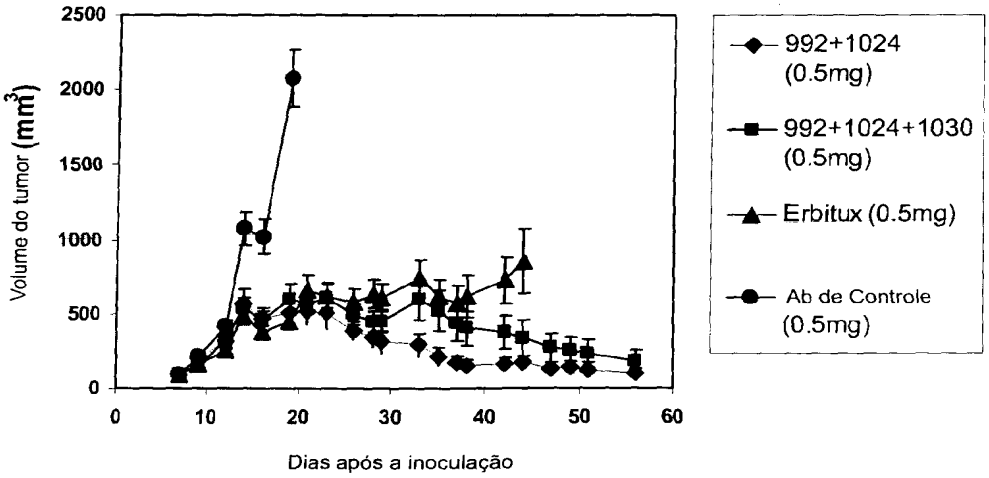

Volume do tumor (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
Dias após a inoculação
992+1024 (0.5mg)
992+1024+1030 (0.5mg)
Erbitux (0.5mg)
Ab de Controle (0.5mg)

Fig. 36

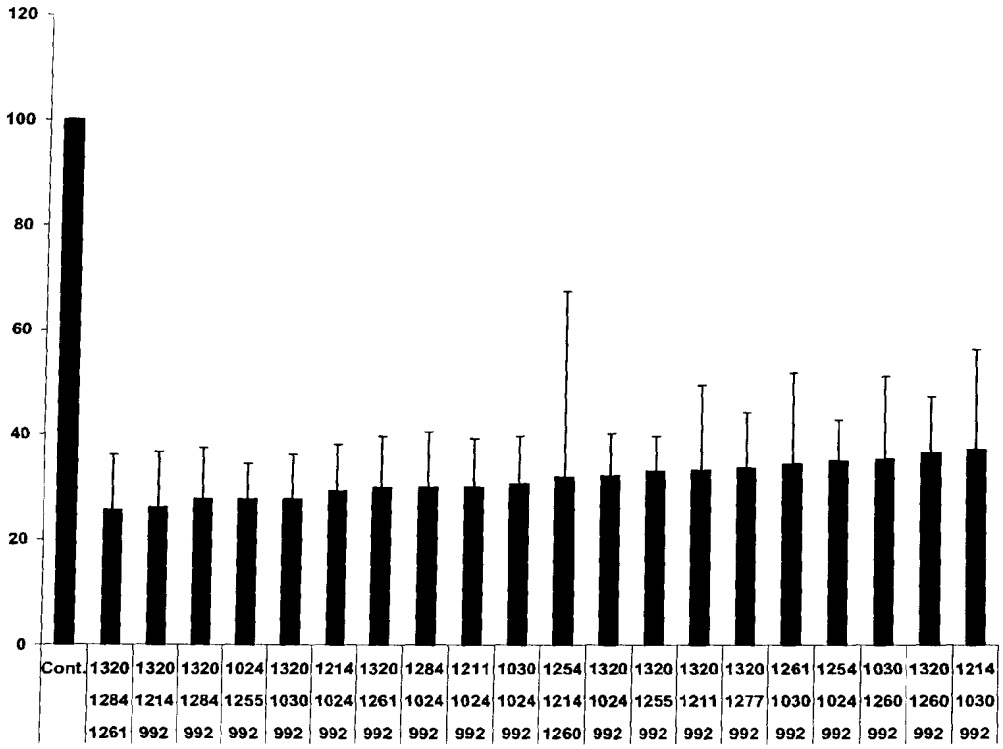

120
100
80
60
40
20
0
Cont. 1320 1320 1320 1024 1320 1214 1320 1284 1211 1030 1254 1320 1320 1320 1320 1261 1254 1030 1320 1214
1284 1214 1284 1255 1030 1024 1261 1024 1024 1024 1214 1024 1255 1211 1277 1030 1024 1260 1260 1030
1261 992 992 992 992 992 992 992 992 992 1260 992 992 992 992 992 992 992 992 992

Fig. 37

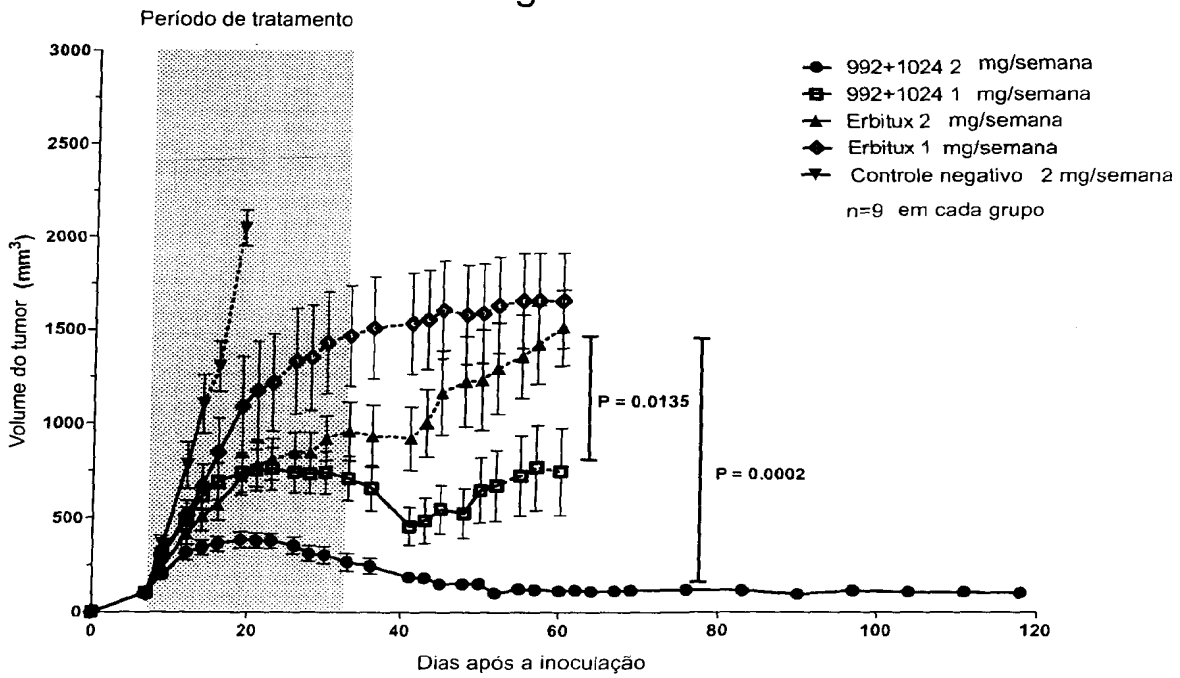

Período de tratamento
992+1024 2 mg/semana
992+1024 1 mg/semana
Erbitux 2 mg/semana
Erbitux 1 mg/semana
Controle negativo 2 mg/semana
n=9 em cada grupo
Volume do tumor (mm³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
P = 0.0135
P = 0.0002
0
20
40
60
80
100
120
Dias após a inoculação

Fig. 38

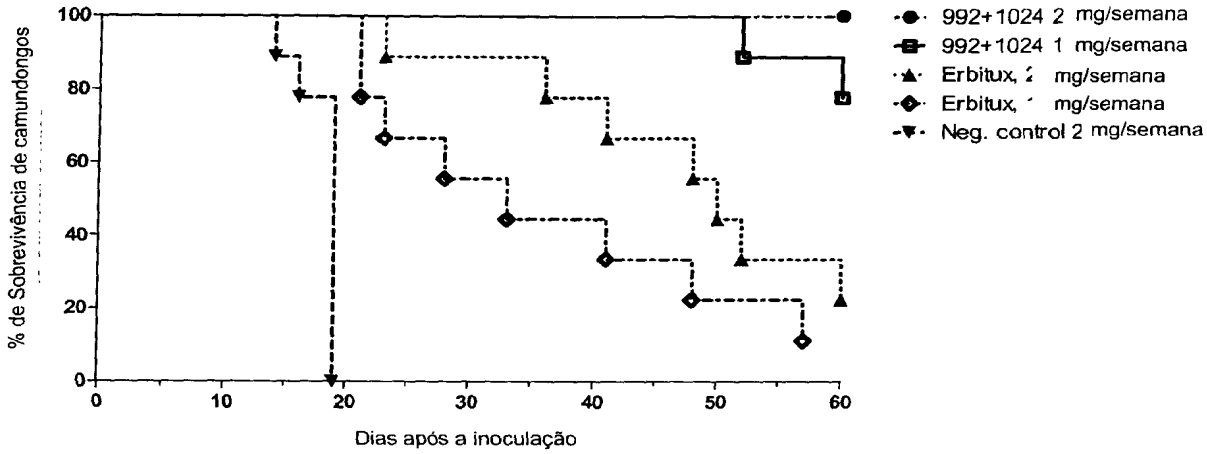


Fig. 39

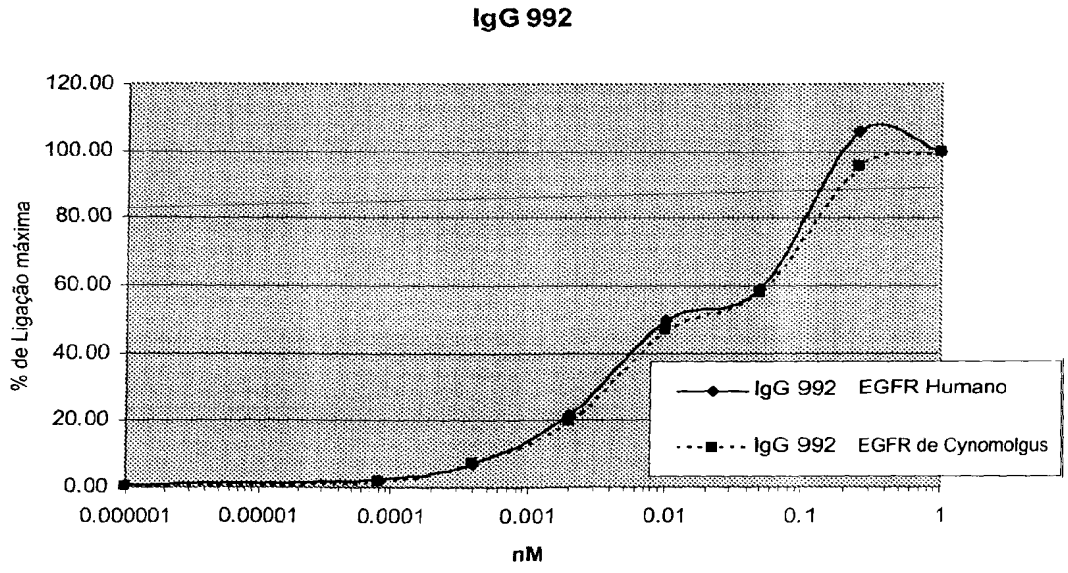


Fig. 40A

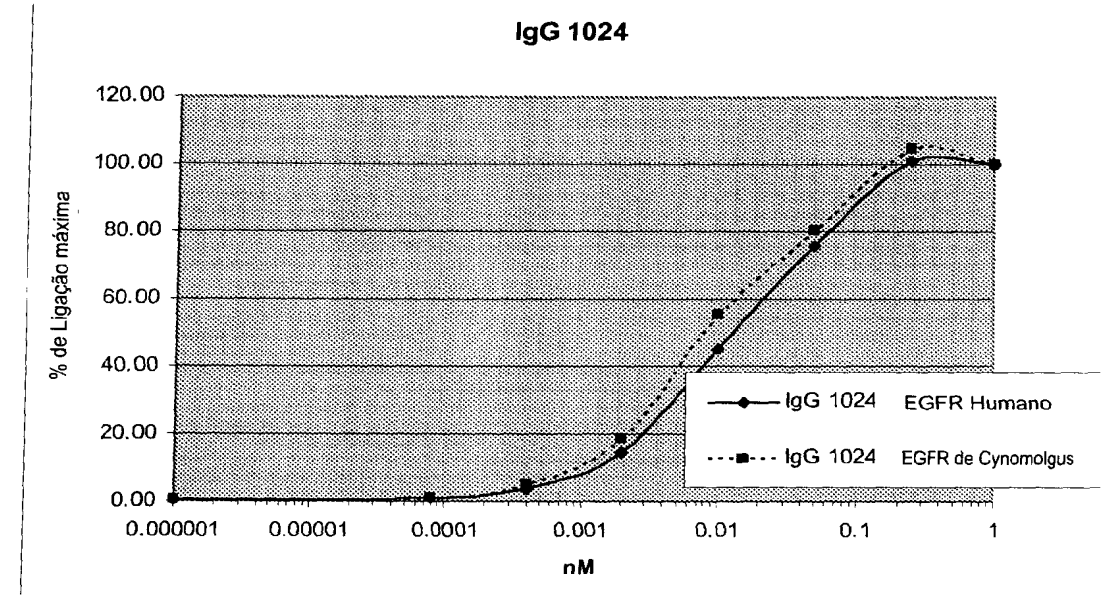


Fig. 40B

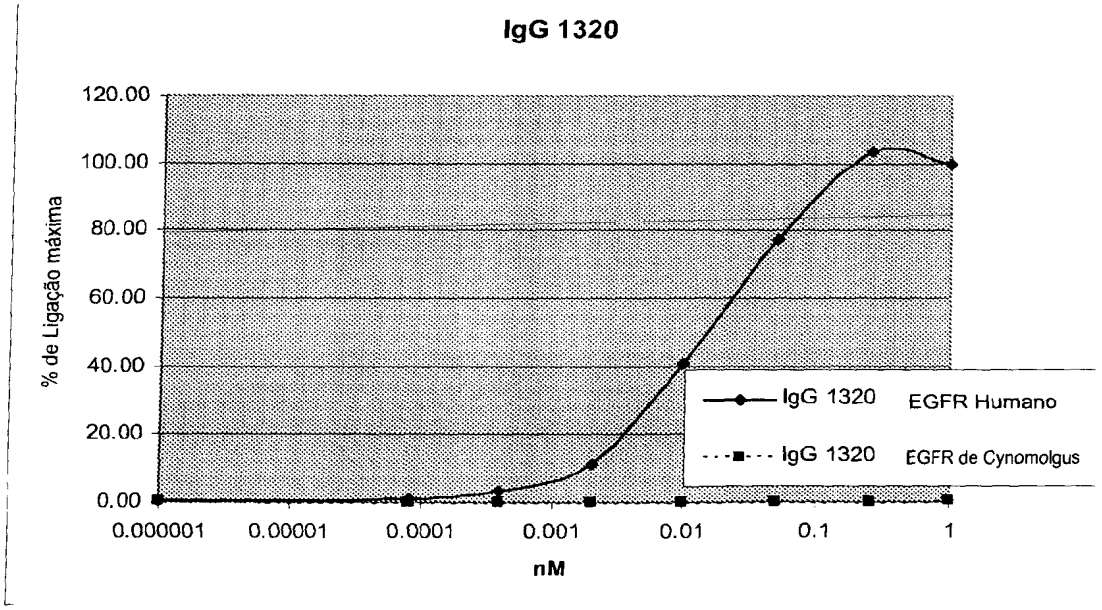


Fig. 40C

```
hu992VH         QVQLVQSGA-EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYW----MHWVRQAPGQGLEWMGIIYPGS 60
chi992VH        EVQLQQPGS-ELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYW----MHWVKQRPGQGLEWIGNIYPGS 60
                :*** *.*: *: :******:**************     ****:* *******:* *****

hu992VH         RST--SYAQKFQ-GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRNGDYYVSSGDAMDY 117
chi992VH        RST--NYDEKFK-SKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYYVSSGDAMDY 117
                ***  .* :**: .:.*:* ***:**.**:**** ***:**********************

hu992VH         WGQGTLVTVS 127
chi992VH        WGQGTSVTVS 127
                ***** ****


hu992VL         DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNY------LAWYQQKPGKVPKLLIYYTS-- 60
chi992VL        DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNY------LNWYQQKPDGTVKLLIYYTS-- 60
                ** ***:.******:*******:**:******* ******* * ******. . ********

Hu992VL         -----TLQSGVP-SRFSGSG-SGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHYNT----VPPTFGGGTKV 124
chi992VL        -----RLHSGVP-SRFSGSG-SGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNT----VPPTFGGGTKL 124
                      *:**** *******  *****:***..:: ******:*****     *******:

hu992VL         EIK 127
chi992VL        EIK 127
                ***
```

Fig. 41A

```
hu1024VH        QVQLVQSGA-EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHW----MHWVRQAPGQGLEWMGWINPSS 60
chi1024VH       QVQLQQPGA-ELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHW----MHWVKQRPGQGLEWIGEINPSS 60
                **** *.***: :**. ***:**************     ****:* *******:* *****

hu1024VH        GRN--NYAQKFQ-GRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARYYGYDE-AMDYWGQG 121
chi1024VH       GRN--NYNEKFK-SKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYYGYDE-AMDYWGQG 121
                ***  ** :**: .:.*:* *.* *****::*****:*:*****.******* ********

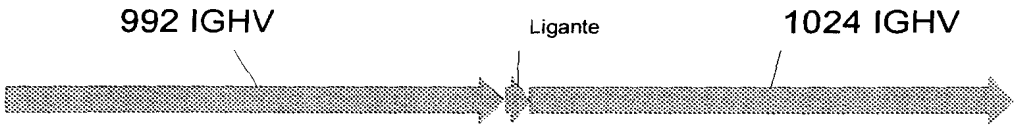
hu1024VH        TSVTVS 127
chi1024VH       TLVTVS 127
                * ****


chi1024VL       DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITY-LYWYLQKPGQSPQLLIYQMS-- 65
hu1024VL        DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITY-LDWYLQKPGQSPQLLIYQMS-- 65
                ******:.:* *** * .********************* * ******************

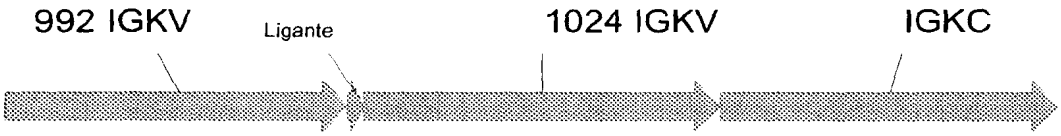
chi1024VL       -----NLASGVP-DRFSSSG--SGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLE----LPYTFGGGTKL 124
hu1024VL        -----NRASGVP-DRFSGSG--SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLE----LPYTFGGGTKV 124
                     * ***** ****.**  *******:********************     **********:

chi1024VL       EIK 127
hu1024VL        EIK 127
                ***
```

Fig. 41B

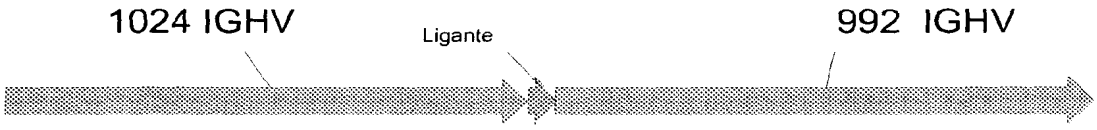


992L1024 IGHV

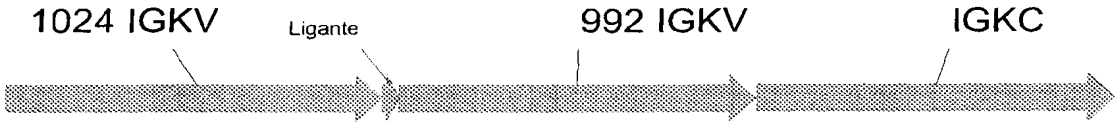


992L1024 IGKV

Fig. 42A



1024L992 IGHV



1024L992 IGKV

Fig. 42B

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES DE ANTICORPO PARA O RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO ANTIEPIDÉRMICO RECOMBINANTE".**

A presente invenção refere-se ao campo de anticorpos recombinantes para uso na terapia de cânceres humanos. Mais especificamente, a invenção fornece composições ou misturas de anticorpos capazes de se ligar ao EGFR humano. As composições de anticorpos com 3 ou mais anticorpos exibem sinergia na redução da proliferação de linhagens de células cancerosas representativas. Foram também obtidos resultados vantajosos com uma composição que compreende dois anticorpos anti-hEGFR quiméricos diferentes que exibem um novo mecanismo de ação baseado na internalização rápida e eficiente do receptor, na indução da diferenciação terminal e na erradicação subsequente do tumor em um modelo animal. Os anticorpos da invenção podem ser produzidos em um biorreator na forma de um anticorpo policlonal.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Symphogen A/S
Pedersen, Mikkel W
Steinaa, Lucilla
Jensen, Allan
Koefoed, Klaus
Meijer, Per-Johan
Carlson, Robert
Pyke, Charles
Nielsen, Lars S

<120> COMPOSIÇÕES DE ANTICORPO PARA O RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO ANTIEPIDÉRMICO RECOMBINANTE

<130> P109PC00

<160> 141

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 1
gacsgatggg cccttggtgg 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 2
gctgtaggtg ctgtctttgc 20

<210> 3

<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 3
tattcccatg gcgcgccsag gtccarctgc arcagyctg 39
<210> 4
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 4
tattcccatg gcgcgccgar gtgmagctkg tkgagtc 37
<210> 5
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 5
tattcccatg gcgcgccsag gtgcagctkm aggagtc 37
<210> 6
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 6
tattcccatg gcgcgcccag gttactctga aagagtc 37
<210> 7

<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 7
tattcccatg gcgcgcccag atccagttgg tgcagtctg 39
<210> 8
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 8
ggcgcgccat gggaatagct agccgayatc cagatgachc arwct 45
<210> 9
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 9
ggcgcgccat gggaatagct agccracatt gtgmtgachc agtc 44
<210> 10
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 10
ggcgcgccat gggaatagct agccsamatt gtkctsaccc artctc 46
<210> 11

<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 11
ggcgcgccat gggaatagct agccgatrtt gtgatgacbc arrct 45
<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 12
ggaggcgctc gagacggtga ccgtggtccc 30
<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 13
ggaggcgctc gagactgtga gagtggtgcc 30
<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 14
ggaggcgctc gagacagtga ccagagtccc 30
<210> 15

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 15
ggaggcgctc gagacggtga ctgaggttcc 30
<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 16
ggacagggmt ccakagttcc adkt 24
<210> 17
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 17
gacagatggt gcagccacag ttcgtttgat ttccagcttg gtg 43
<210> 18
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 18
gacagatggt gcagccacag ttcgttttat ttccagcttg gtc 43
<210> 19

<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 19
gacagatggt gcagccacag ttcgttttat ttccaacttt gtc 43
<210> 20
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 20
gacagatggt gcagccacag ttcgtttcag ctccagcttg gtc 43
<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 21
gaactgtggc tgcaccatct gtc 23
<210> 22
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 22
accgcctcca ccggcggccg cttattaaca ctctcccctg ttg 43
<210> 23

<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 23
accgcctcca ccggcggccg cttattaaca ctctcccctg ttgaagctct t 51
<210> 24
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 24
cgcgccgagg tccaactgca gcaacctggg tctgagctgg tgaggcctgg agcttcagtg 60
aagctgtcct gcaaggcttc tggctacaca ttcaccagct actggatgca ctgggtgaag 120
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt gggaatattt atcctggtag tcgtagtact 180
aactacgatg agaagttcaa gagcaaggcc acactgactg tagacacatc ctccagcaca 240
gcctacatgc agctcagcag cctgacatct gaggactctg cggtctatta ctgtacaaga 300
aatggggatt actacgttag tagcggggat gctatggact actggggtca aggaacctca 360
gtcaccgtct cg 372
<210> 25
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 25
cgcgcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactgg tggagcctgg gggttcagtg 60
aagctgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcaccagtc actggatgca ctgggtgaag 120
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggata ggtgagatta atcctagcag cggtcgtaat 180
aactacaatg agaagttcaa gagtaaggcc acactgactg tagacaaatc ctccagcaca 240
gcctacatgc aattcagcag cctgacatct gaggactctg cggtctatta ttgtgtaaga 300
tactatggtt acgacgaagc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcg 360
<210> 26
<211> 360

<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 26
cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg agggtccctg 60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcact ttcagtagtt atgccctgtc ttgggttcgc 120
cagactccag agaggaggct ggagtgggtc gcatccatta gtggtgttgg tagcacctac 180
tttccagaca gtgtgaaggg ccgtttcacc atgtccagag ataatgccag gaacatcctg 240
tacctccaaa tgagcagtct gaggtctgag gacacggcca tgtattactg tgcaagaggt 300
tctgatggtt acttctatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcg 360
<210> 27
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 27
cgcgcccagg tgcagcttca gcagcctggg gctgaactgg tgaagcctgg ggcttcagtg 60
aagctgtcct gtaaggcttc tggctacacc ttcaccagcc actggatgca ctgggtgcag 120
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt ggagagattc atcctagcaa cggtcgtact 180
aactacaatg agaagttcaa gaacaaggcc acactgactg tagacaaatc tcccagcaca 240
gcctacatgc aactcagcag tttgacatct gaggactctg cggtctatta ctgtgcaaga 300
tactatggtt acgacgatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcg 360
<210> 28
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 28
cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg agggtccctg 60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcgct ttcagtagct atgacatgtc ttgggttcgc 120
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcatacattg gtagtggtga tgataatacc 180
cactatccag actctgtgaa gggccgattc accatctcca gacacaatgc caaaaacacc 240
ctatacctgc aaatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatgtatta ctgtgcaaga 300
cagaagtatg gtaactacgg ggacactatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360
gtctcg 366

<210> 29
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 29
cgcgcccagg ttcagctgaa ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 60
tccatcactt gctctgtctc tggtttttca ttaaccatct atggtgtaca ctgggttcgc 120
cagcctccag gaaagggtct ggagtggctg ggagttatgt gggctggtgg aaatacagat 180
tataattcgg ctctcatgtc cagactgaac atcagcaagg acaattccaa gagccaagtt 240
ttcttaaaag tgaacagtct acaaactgat gacacagcca tgtactattg taccagagat 300
cccgatggtt actacgtggg gtggttcttc gatgtctggg gcgcggggac cacggtcacc 360
gtctcg 366
<210> 30
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 30
cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg agggtccctg 60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcgct tacagtacct atgacatgtc ttgggttcgc 120
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcatacatta gtagtggtgg tgatgccgcc 180
tactatcccg acactgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caaaaacacc 240
ctatacctgc aaatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatgtatta ctgtgcgagg 300
tctcgctatg gaaactacgg ggacgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360
gtctcg 366
<210> 31
<211> 375
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 31
cgcgccgagg tccagctgca acagtctgga cctgagctgg tgaaacctgg ggcttcagtg 60
aagataccct gcaagacttc tggatacact ttcactgact acaacatggc ctgggtgaag 120
cagagccatg gaaagagcct tgagtggatt ggagatatta ttcctaacaa tggtggtgct 180

atctacaacc agaaattcaa gggcaaggcc actttgactg tagacaaatc ctccagtaca 240
gcctccatgg agctccgcag cctgacatct gaggacactg cagtctattt ctgtgcaaga 300
aagaatatct actataggta cgacggggca ggtgctctgg actactgggg tcaaggaacc 360
tcagtcaccg tctcg 375

<210> 32
<211> 351
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 32

cgcgcccagg tgcagctgaa ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 60
tccatcactt gcactgtctc tgggttttca ttaaccacct atggggtaca ctgggttcgc 120
cagcctccag gaaagggtct ggagtggctg ggagtaatat gggctggtgg aagcacaaat 180
tataattcgg ctctcatgtc cagactgagc atcaagaaag acaactccaa gagccaagtt 240
ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca tgtactactg tgccagagcc 300
tatggttaca actttgacta ttggggccaa ggcaccactc tcacagtctc g 351

<210> 33
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 33

cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg agggtccctg 60
aaactctcct gtgcagtctc tggattcact ttcagtagct atgtcatgtc ttgggttcgc 120
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcaaccatta ctagtggtgg taggaacatc 180
tactatctag acagtgtgaa ggggcgattc actatctcca gagacaatgc caagaacacc 240
ctgtacctgc aaatgagcag tctgaggtct gaggacacgg ccatgtatta ctgtgcaaga 300
catgaggact ataggtacga cggttactat gctatggact actggggtca aggaacctca 360
gtcaccgtct cg 372

<210> 34
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 34

cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg agagtccttg 60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcgct ttcagttact ctgacatgtc ttgggttcgc 120
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcatacatga gtagtgctgg tgatgtcacc 180
ttctattcag acactgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caagaacacc 240
ctgtatctgc aagtgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatatatta ctgtgtaaga 300
caccgggacg tggctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcg 354

<210> 35
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 35

cgcgcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactgg tgaagcctgg ggcttcagtg 60
aagctgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcaccagcg actggatgca ctggatgaaa 120
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt ggagagatta atcctagtaa cggtcgctct 180
agctacaatg agaagttcaa gagcaaggcc acactgactg tagacaaatc ctccagcaca 240
gcctacatgc aactcagcag cctgacatct gaggactctg cggtctatta ctgtgcaaga 300
ataggtggta tctacgtgga gacttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcg 357

<210> 36
<211> 375
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 36

cgcgccgagg tccagcttca gcagtctgga gctgagctgg tgaggcctgg gtcctcagtg 60
aagatttcct gcaaggcttc tggctatgca ttcagtagct actggatgaa ctgggtgagg 120
cagaggcctg gacagggtct tgagtggatt ggacagattt atcctggaga tggtgatact 180
aactacaatg gaaagttcaa gggtagagcc acactgactg caaacaaatc ctccagcaca 240
gcctacatgc agctcagcag cctaacatct gaggactctg cggtctattt ctgtgcaaga 300
agggcatctt ccctctatga tgtttacccc tactactttg actactgggg ccaaggcacc 360
actctcacag tctcg 375

<210> 37
<211> 363
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

cgcgcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactgg tgaagcctgg ggcttcaatg 60

aagctgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcaccaact actggatgca ctgggtgaag 120

cagaggcctg gacaaggcct tgaatggatt ggagaaatta atcctagcaa cggtcgtact 180

aattacaatg agaagttcaa gagcaaggcc acactgactg tagacaaatc gtccagcaca 240

gcctacatgc aactcagcag cctgacatct gaggactctg gggtctatta ctgtgcaaaa 300

gggggggaact actatgatta cgactgggac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360

tcg 363

<210> 38

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

cgcgcccagg tgcagctgaa ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 60

tccatcactt gcactgtctc tgggttttca ttaaccatct atggtgtaca ctgggttcgc 120

cagcctccag gaaagggtct ggagtggctg ggagtaatat gggctggtgg aaacacaaat 180

tataattcgg ctctcatgtc cagactgagc atcagcaaag acaactccaa gagtcaagtt 240

ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca tgtacttctg tgccagaggc 300

tatggctaca atttagacta ttggggccaa ggcaccactc tcacagtctc g 351

<210> 39

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

cgcgcccagg tgcagctgaa ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 60

tccatcacat gcaccgtctc aggattctca ttaaccggcc atggtgtaaa ctgggttcgc 120

cagcctccag gaaagggtct ggagtggctg ggaatgatat ggggtgatgg aagcacggac 180

tataattcaa ctctcaaatc cagactgagt atcagcaagg acaactccaa gagccaagtt 240

ttcttaaaaa tgaacagtct gcagactgat gacaccgcca ggtactactg tgccagaggc 300

tacggctacc tttactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcg 357

<210> 40

<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 40

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

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 41

Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Glu Pro
1 5 10 15
Gly Gly Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser His Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Glu

50 55 60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120

<210> 42
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 42

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

<210> 43
<211> 120

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43
Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro
1 5 10 15
Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser His Trp Met His Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Glu Ile His Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu
50 55 60
Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Pro Ser Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120
<210> 44
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 44
Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
1 5 10 15
Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
35 40 45
Trp Val Ala Tyr Ile Gly Ser Gly Asp Asp Asn Thr His Tyr Pro Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Gln Lys Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Thr Met Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120

<210> 45
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 45

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

<210> 46
<211> 122
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 46
Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
1 5 10 15
Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Tyr Ser
20 25 30
Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
35 40 45
Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asp Ala Ala Tyr Tyr Pro Asp
50 55 60
Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Ser Arg Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120
<210> 47
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 47
Arg Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
1 5 10 15
Gly Ala Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Asp Tyr Asn Met Ala Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Asn Asn Gly Gly Ala Ile Tyr Asn Gln
50 55 60
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr

65 70 75 80
Ala Ser Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Phe Cys Ala Arg Lys Asn Ile Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Ala Gly Ala
100 105 110
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 48
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 48
Arg Ala Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
1 5 10 15
Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30
Thr Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
50 55 60
Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ala Tyr Gly Tyr Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Leu Thr Val Ser
115

<210> 49
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

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

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

Ser Tyr Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Arg Asn Ile Tyr Tyr Leu Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg His Glu Asp Tyr Arg Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

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

<210> 50

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

Gly Glu Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser
20 25 30

Tyr Ser Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala Tyr Met Ser Ser Ala Gly Asp Val Thr Phe Tyr Ser Asp
50 55 60

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

<210> 51
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 51

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

<210> 52
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 52

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

<210> 53
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 53

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Asn Tyr Tyr Asp Tyr Asp Trp Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

115 120

<210> 54

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr

20 25 30

Ile Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala

50 55 60

Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Asn Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser

115

<210> 55

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

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

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

Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
115

<210> 56

<211> 648

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

ctagccgaca ttcagatgac tcagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 60

gtcaccatca gttgcaggac aagtcaggac attggcaatt atttaaactg gtatcagcag 120

aaaccagatg gaactgttaa actcctgatc tactacacat caagattaca ctcaggagtc 180

ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattttt ctctcaccat taacaacgtg 240

gagcaagagg atgttgccac ttacttttgc caacactata atacggttcc tccgacgttc 300

ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 57

<211> 663
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 57
ctagccgaca tcgtgatgac acaagctgca ttctccaatc cagtcactct tggaacatca 60
gcttccatct cctgcaggtc tagtaagagt ctcctacata gtaatggcat cacttatttg 120
tattggtatc tgcagaagcc aggccagtct cctcagctcc tgatttatca gatgtccaac 180
cttgcctcag gagtcccaga caggttcagt agcagtgggt caggaactga tttcacactg 240
agaatcagca gagtggaggc tgaggatgtg ggtgtttatt actgtgctca aaatctagaa 300
cttccgtaca cgttcggagg ggggaccaag ctggaaataa aacgaactgt ggctgcacca 360
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg 420
tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc 480
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 540
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 600
tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag 660
tgt 663
<210> 58
<211> 660
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 58
ctagccgaca ttgtgctgac tcagtctcct gcttccttag ctgtatctct ggggcagagg 60
gccaccattt catgcagggc cagcaaaagt gtcagtacat ctggctatag ttttatgcac 120
tggtaccaac tgaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctatcttgc atccaaccta 180
gaatctgggg tccctgccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt caccctcaac 240
atccatcctg tggaagagga ggatgctgca acctattact gtcagcacag tagggagttt 300
ccgttaacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 59
<211> 657
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 59
gatattgtga tgactcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcctgattt atcagatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaagaa ctgatttcac actgagaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657
<210> 60
<211> 660
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 60
ctagccgatg ttgtgatgac tcagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 60
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc cttgtacaca gtaatggaaa cacctattta 120
cattggtacc tgcagaagcc aggccagtct ccaaaactcc tgatctacaa agtttccaac 180
cgattttctg gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat cagggacaga tttcacactc 240
aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aagtacacat 300
gttcccacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 61
<211> 648
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 61

ctagccgaca ttgtgatgac ccagtctcac aaattcatgt ccacatcagt gggagacagg 60
gtcagcatca cctgcaaggc cagtcaggat gtgactaatg ccgtagcctg gtatcaacaa 120
aaaccaggac aatctcctaa actactgatt tactgggcat ccatccgaca cactggagtc 180
cctgatcgct tcacaggcag tagatctggg acagattata ctctcaccat caacagtgtg 240
caggctgaag acctggccct ttattattgt cagcaacatt ataacactcc gctcacgttc 300
ggtgctggga ccaagctgga aataaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 62
<211> 660
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 62

ctagccgatg ttgtgatgac acagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 60
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc cttgtacaca gtaatggtaa cacctattta 120
cattggtacc tgcagaagcc aggccagtct ccaaagctcc tgctctacaa agtttccaac 180
cgattttctg gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat cagggacaga tttcacactc 240
aagatcagca gagtggagtc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aaatacacat 300
gtgtacacgt tcggaggggg gacaaagttg gaaataaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 63
<211> 645
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 63
ctagcccaaa ttgtgctcac acagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 60
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tttactggta ccagcagaag 120
ccaggatcct cccccagact cctgatttat gacgcatcca acctggcttc tggagtccct 180
gttcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag ccgaatggag 240
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagca gttacccaat cacgttcggc 300
tcggggacaa agttggaaat aaaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645
<210> 64
<211> 648
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 64
ctagccgata tccagatgac tcagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 60
gtcaccatca gttgcagtgc aagtcagggc attaccaatt atttaaactg gtatcagcag 120
aaaccagatg gaactgttaa actcctgatc tattactcat caagtttaca ctcaggagtc 180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctggg acagattatt ctctcaccat cagcaacctg 240
gaacctgaag atattgccac ttactattgt cagcagtata gtgagattcc gtacacgttc 300
ggaggggga ccaagctgga gctgaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 65
<211> 645
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 65
ctagcccaaa ttgtgctgac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 60
gtcaccataa cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggtt ccagcagaag 120
ccaggcactt ctcccaaact ctggatttat agtacatcca acctggcttc tggagtccct 180
gctcgcttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactctc tcacaatcag ccgaatggag 240
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gttacccata cacgttcgga 300
gggggggacca agctggagct gaaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645
<210> 66
<211> 660
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 66
ctagccgatg ttgtgatgac ccagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 60
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc cttgtacaca gtaatggaaa cacctattta 120
cattggtacc tgcagaagcc aggccagtct ccaaagctcc tgatctacaa agtttccaac 180
cgattttctg gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat cagggacaga tttcacactc 240
aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aagtacacat 300
gttccgacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 67
<211> 660
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 67
ctagccgaca ttgtgctaac acagtctcct gcttccttag ctgtatctct ggggcagagg 60
gccaccatct catgcagggc cagccaaagt gtcagtacat ctacctatag ttatatgcac 120
tggtatcaac agaaatcagg acagccaccc aaactcctca tcaagtatgc atccaaccta 180
gagtctgggg tccctgccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt caccctcaac 240
atccatcctg tggaggagga ggatactgca acatattact gtcagcacag ttgggagatt 300
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 68
<211> 648
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 68
ctagccgaca tccagatgac acaaactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 60
gtcaccatca gttgcagggc aagtcaggac attagcaatt atttaaactg gtatcagcag 120
aaaccagatg gaactgttaa agtcctgatc tactacacat caagattaca ctcaggagtc 180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcaccat tagcaacctg 240
gagcaagaag atattgccac ttacttttgc caacagggta atacgcttcc gtacacgttc 300
ggaggggga ccaagctgga ataaaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 69
<211> 648
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 69
ctagccgaca ttcagatgac ccagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 60
gtcaccatca gttgcagtgc aagtcaggac attagcaatt atttaaactg gtatcagcag 120
aaaccagatg gaactgttaa actcctgatc tatcacacat caactttaca ctcaggagtc 180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctggg acagattatt ctctcaccat cagcaacctg 240
gaacctgaag atattgccac ttactattgt cagcaatata gtaagcttcc gtggacgttc 300
ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648
<210> 70
<211> 648
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 70
ctagccgaca ttcagatgac acagactact tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 60
gtcaccatta gttgcagtgc aagtcagggc attagtaatt atttaaactg gtatcagcag 120
aaaccagatg gaactgttaa actcctgatc tattacacat caagtttaca ctcaggagtc 180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctggg acagattatt ctctcaccat cagcaacctg 240
gaacctgaag atattgccac ttactattgt cagcagtata gtaagcttcc gtacacgttc 300
ggaggggga ccaagctgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 71
<211> 651
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 71
ctagccgaaa atgtgctgac tcagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggaaaag 60
gtcaccatga cctgcagggc cagctcaagt gtaagttcca gttacttgca ctggtaccag 120
caaaagtcag gtgcctcccc caaactctgg atttatagca catccaactt ggcttctgga 180
gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac agtcaacagt 240
gtggagactg aagatgctgc cacttattac tgccaccagt acagtggttt cccattcacg 300
ttcggctcgg ggaccaagct ggagctgaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg t 651
<210> 72
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 72
Leu Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15
Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly
20 25 30
Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Asn Val
65 70 75 80
Glu Gln Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Asn Thr Val

85 90 95

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 73
<211> 221
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 73

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

Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu
20 25 30

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

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

Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
65 70 75 80

Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
100 105 110
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
115 120 125
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
130 135 140
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
145 150 155 160
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
165 170 175
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
180 185 190
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
195 200 205
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 74
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 74

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

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

<210> 75
<211> 219
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 75

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

Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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> 76
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 76

Leu Ala Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
1 5 10 15
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
20 25 30
His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
35 40 45
Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

<210> 77
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 77

Leu Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser
1 5 10 15
Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Thr
20 25 30
Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
35 40 45

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

<210> 78
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 78

Leu Ala Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
1 5 10 15
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
20 25 30
His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly

35 40 45

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser
85 90 95

Gln Asn Thr His Val Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 79

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

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

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

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

<210> 80
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 80

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

20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu
65 70 75 80

Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Ile
85 90 95

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 81
<211> 215
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 81

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

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

<210> 82
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 82

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

1 5 10 15

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
20 25 30

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

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

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser
85 90 95

Gln Ser Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 83

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

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

<210> 84
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

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

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30

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

Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu
65 70 75 80

Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
85 90 95

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

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 85

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

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

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu
65 70 75 80

Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu
85 90 95

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

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 86

<211> 216

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 86

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

<210> 87

<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 87

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

<210> 88
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 88
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 60
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 120
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 180
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 240
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttaa 300
taagcggccg ccggtggagg cggt 324
<210> 89
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 89
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105
<210> 90
<211> 1602

<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Éxon
<222> (1)..(298)
<220>
<221> Íntron
<222> (299)..(689)
<220>
<221> Éxon
<222> (690)..(734)
<220>
<221> Íntron
<222> (735)..(852)
<220>
<221> Éxon
<222> (853)..(1182)
<220>
<221> Íntron
<222> (1183)..(1279)
<220>
<221> Éxon
<222> (1280)..(1602)
<400> 90

agt gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc 48
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15
aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac 96
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
20 25 30
tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc 144
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

```
        35                  40                  45
agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac   192
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
    50                  55                  60
tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag   240
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
65                  70                  75                  80
acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac   288
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
                85                  90                  95
aag aga gtt g gtgagaggcc agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag         338
Lys Arg Val
ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcatc ccggctatgc agtcccagtc cagggcagca 398
aggcaggccc cgtctgcctc ttcacccgga ggcctctgcc cgccccactc atgctcaggg 458
agagggtctt ctggcttttt ccccaggctc tgggcaggca caggctaggt gcccctaacc 518
caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc catatccggg 578
aggaccctgc ccctgaccta agcccacccc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg 638
gacaccttct ctcctcccag attccagtaa ctcccaatct tctctctgca g ag  ccc  694
                                                        Glu Pro
aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca g gtaagccagc  744
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            105                 110
ccaggcctcg ccctccagct caaggcggga caggtgccct agagtagcct gcatccaggg 804
acaggcccca gccgggtgct gacacgtcca cctccatctc ttcctcag ca  cct gaa  860
                                                    Ala Pro Glu
ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac   908
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        120                 125                 130
acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac   956
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    135                 140                 145
gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc  1004
```

```
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
150                 155                 160                 165
gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac  1052
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                170                 175                 180
agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg  1100
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            185                 190                 195
ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca  1148
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        200                 205                 210
gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa g gtgggacccg         1192
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    215                 220
tggggtgcga gggccacatg gacagaggcc ggctcggccc accctctgcc ctgagagtga 1252
ccgctgtacc aacctctgtc cctacag gg  cag ccc cga gaa cca cag gtg tac 1305
                              Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                                                  230
acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg  1353
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    235                 240                 245
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg  1401
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
250                 255                 260                 265
gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg  1449
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
                270                 275                 280
ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac  1497
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            285                 290                 295
aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat   1545
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
```

300 305 310

gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg 1593
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
315 320 325

ggt aaa tga 1602
Gly Lys
330

<210> 91
<211> 331
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 91

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

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

<210> 92
<211> 751
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Construto sintético
<400> 92

ggcgcgccga ggtccaactg cagcaacctg ggtctgagct ggtgaggcct ggagcttcag 60
tgaagctgtc ctgcaaggct tctggctaca cattcaccag ctactggatg cactgggtga 120
agcagaggcc tggacaaggc cttgagtgga ttgggaatat ttatcctggt agtcgtagta 180

ctaactacga tgagaagttc aagagcaagg ccacactgac tgtagacaca tcctccagca 240
cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaggactc tgcggtctat tactgtacaa 300
gaaatgggga ttactacgtt agtagcgggg atgctatgga ctactggggt caaggaacct 360
cagtcaccgt ctcgtcagcc agcaccaagg gcccccaggt ccaactgcag cagcctgggg 420
ctgaactggt ggagcctggg ggttcagtga agctgtcctg caaggcttct ggctacacct 480
tcaccagtca ctggatgcac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gagtggatag 540
gtgagattaa tcctagcagc ggtcgtaata actacaatga gaagttcaag agtaaggcca 600
cactgactgt agacaaatcc tccagcacag cctacatgca attcagcagc ctgacatctg 660
aggactctgc ggtctattat tgtgtaagat actatggtta cgacgaagct atggactact 720
ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcga g 751

<210> 93
<211> 1017
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Construto sintético
<400> 93

gctagccgac attcagatga ctcagactac atcctccctg tctgcctctc tgggagacag 60
agtcaccatc agttgcagga caagtcagga cattggcaat tatttaaact ggtatcagca 120
gaaaccagat ggaactgtta aactcctgat ctactacaca tcaagattac actcaggagt 180
cccatcaagg ttcagtggca gtgggtctgg aacagatttt tctctcacca ttaacaacgt 240
ggagcaagag gatgttgcca cttacttttg ccaacactat aatacggttc ctccgacgtt 300
cggtggaggc accaagctgg aaatcaaacg aactgtggct gcaccagaca tcgtgatgac 360
acaagctgca ttctccaatc cagtcactct tggaacatca gcttccatct cctgcaggtc 420
tagtaagagt ctcctacata gtaatggcat cacttatttg tattggtatc tgcagaagcc 480
aggccagtct cctcagctcc tgatttatca gatgtccaac cttgcctcag gagtcccaga 540
caggttcagt agcagtgggt caggaactga tttcacactg agaatcagca gagtggaggc 600
tgaggatgtg ggtgtttatt actgtgctca aaatctagaa cttccgtaca cgttcggagg 660
ggggaccaag ctggaaataa aacgaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc 720
atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga ataacttcta 780
tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca 840
ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac 900

gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg 960
cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttaataag cggccgc 1017

<210> 94
<211> 751
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Construto sintético
<400> 94

ggcgcgccca ggtccaactg cagcagcctg gggctgaact ggtggagcct gggggttcag 60
tgaagctgtc ctgcaaggct tctggctaca ccttcaccag tcactggatg cactgggtga 120
agcagaggcc tggacaaggc cttgagtgga taggtgagat taatcctagc agcggtcgta 180
ataactacaa tgagaagttc aagagtaagg ccacactgac tgtagacaaa tcctccagca 240
cagcctacat gcaattcagc agcctgacat ctgaggactc tgcggtctat tattgtgtaa 300
gatactatgg ttacgacgaa gctatggact actggggtca aggaacctca gtcaccgtct 360
cgtcagccag caccaagggc cccgaggtcc aactgcagca acctgggtct gagctggtga 420
ggcctggagc ttcagtgaag ctgtcctgca aggcttctgg ctacacattc accagctact 480
ggatgcactg ggtgaagcag aggcctggac aaggccttga gtggattggg aatatttatc 540
ctggtagtcg tagtactaac tacgatgaga agttcaagag caaggccaca ctgactgtag 600
acacatcctc cagcacagcc tacatgcagc tcagcagcct gacatctgag gactctgcgg 660
tctattactg tacaagaaat ggggattact acgttagtag cggggatgct atggactact 720
ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcga g 751

<210> 95
<211> 1017
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Construto sintético
<400> 95

gctagccgac atcgtgatga cacaagctgc attctccaat ccagtcactc ttggaacatc 60
agcttccatc tcctgcaggt ctagtaagag tctcctacat agtaatggca tcacttattt 120
gtattggtat ctgcagaagc caggccagtc tcctcagctc ctgatttatc agatgtccaa 180

ccttgcctca ggagtcccag acaggttcag tagcagtggg tcaggaactg atttcacact 240
gagaatcagc agagtggagg ctgaggatgt gggtgtttat tactgtgctc aaaatctaga 300
acttccgtac acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgaactg tggctgcacc 360
agacattcag atgactcaga ctacatcctc cctgtctgcc tctctgggag acagagtcac 420
catcagttgc aggacaagtc aggacattgg caattattta aactggtatc agcagaaacc 480
agatggaact gttaaactcc tgatctacta cacatcaaga ttacactcag gagtcccatc 540
aaggttcagt ggcagtgggt ctggaacaga tttttctctc accattaaca acgtggagca 600
agaggatgtt gccacttact tttgccaaca ctataatacg gttcctccga cgttcggtgg 660
aggcaccaag ctggaaatca aacgaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc 720
atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga ataacttcta 780
tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca 840
ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac 900
gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg 960
cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttaataag cggccgc 1017

<210> 96
<211> 249
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Construto sintético
<400> 96

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

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Glu
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
145 150 155 160

Thr Ser His Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn
180 185 190

Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
195 200 205

Thr Ala Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
245

<210> 97
<211> 334
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Construto sintéticoa
<400> 97

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

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly
20 25 30

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

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
290 295 300
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
305 310 315 320
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 98
<211> 249
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Construto sintéticoa
<400> 98

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

145 150 155 160
Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175
Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Lys
180 185 190
Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
195 200 205
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
210 215 220
Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp
225 230 235 240
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
245

<210> 99
<211> 334
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Construto sintéticoa
<400> 99

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

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

<210> 100

<211> 1863

<212> DNA

<213> Macaca fascicularis

<400> 100

ctggaggaaa agaaagtttg ccaaggcacg agtaacaaac tcacgcagtt gggcactttt 60

gaagatcatt ttctcagcct ccagaggatg ttcaataact gtgaggtggt ccttgggaat 120

ttggaaatta cctacgtgca gaggaattat gatctttcct tcttaaagac catccaggag 180

gtggctggtt atgtcctcat cgccctcaac acagtggagc ggattccttt ggaaaacctg 240

cagatcatca gaggaaacat gtactatgaa aattcctatg ccttagcagt cttatctaac 300

tatgatgcaa ataaaaccgg actgaaggag ctgcccatga gaaacttaca ggaaatcctg 360

catggcgccg tgcggttcag caacaaccct gccctgtgca acgtggagag catccagtgg 420

cgggacatag tcagcagcga gtttctcagc aacatgtcga tggacttcca gaaccacctg 480

ggcagctgcc aaaagtgtga tccaagctgt cccaatggga gctgctgggg tgcaggagag 540

gagaactgcc agaaactgac caaaatcatc tgtgcccagc agtgctccgg gcgctgccgc 600

ggcaagtccc ccagtgactg ctgccacaac cagtgtgccg cgggctgcac gggcccccgg 660

gagagcgact gcctggtctg ccgcaaattc cgagacgaag ccacgtgcaa ggacacctgc 720

cccccactca tgctctacaa ccccaccaca taccagatgg atgtgaaccc cgagggcaaa 780

tacagctttg gtgccacctg cgtgaagaag tgtccccgta attatgtggt gacagatcac 840

ggctcgtgcg tccgagcctg cggggccgac agctatgaga tggaggaaga cggcgtccgc 900

aagtgtaaga agtgcgaagg gccttgccgc aaagtgtgta atggaatagg tattggtgaa 960

tttaaagaca cactctccat aaatgctaca aatattaaac acttcaaaaa ctgcacctcc 1020

atcagtggcg atctccacat cctgccggtg gcatttaggg gtgactcctt cacacacact 1080

ccgcctctgg atccacagga actggatatt ctgaaaaccg taaaggaaat cacagggttt 1140

ttgctgattc aggcttggcc tgaaaacagg acggacctcc atgcttttga gaacctagaa 1200

atcatacgtg gcaggaccaa gcaacacggt cagttttctc ttgcggtcgt cagcctgaac 1260

ataacatcct tgggattacg ctccctcaag gagataagcg atggagatgt gataatttca 1320

ggaaacaaaa atttgtgcta tgcaaataca ataaactgga aaaaactgtt tgggacctcc 1380

agtcagaaaa ccaaaattat aagcaacaga ggtgaaaaca gctgcaaggc cacgggccag 1440

gtctgccatg ccttgtgctc ccccgagggc tgctggggcc cggagcccag ggactgcgtc 1500

tcctgccaga atgtcagccg aggcagagaa tgcgtggaca agtgcaacat cctggagggc 1560

gagccaaggg agtttgtgga gaactctgag tgcatacagt gccacccaga atgcctgccc 1620

caggtcatga acatcacctg cacaggacgg ggaccagaca actgtatcca gtgtgcccac 1680

tacattgacg gcccccactg cgtcaagacc tgcccagcag gagtcatggg agaaaacaac 1740

accctggtct ggaagtacgc agacgccggc cacgtgtgcc acctgtgcca tccaaactgc 1800
acctacggat gcactgggcc aggtcttgaa ggctgtgcaa ggaacgggcc taagatccca 1860
tcc 1863

<210> 101
<211> 621
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 101

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

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

Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Ser Gln Lys Thr
450 455 460
Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln
465 470 475 480
Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro
485 490 495
Arg Asp Cys Val Ser Cys Gln Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val
500 505 510
Asp Lys Cys Asn Ile Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn
515 520 525
Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Val Met Asn
530 535 540
Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His
545 550 555 560
Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met
565 570 575
Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
580 585 590
Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly
595 600 605
Leu Glu Gly Cys Ala Arg Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser
610 615 620

<210> 102
<211> 3633
<212> DNA
<213> Macaca fascicularis
<400> 102

atgcgaccct ccgggacggc cggggccgcg ctcctggcgc tgctggctgc gctttgcccc 60
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa actcacgcag 120
ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg 180
gtccttggga atttggaaat tacctacgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag 240
accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc atcgccctca acacagtgga gcggattcct 300

ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaac atgtactatg aaaattccta tgccttagca 360
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccat gagaaactta 420
caggaaatcc tgcatggcgc cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag 480
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagc gagtttctca gcaacatgtc gatggacttc 540
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg 600
ggtgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgccca gcagtgctcc 660
gggcgctgcc gcggcaagtc ccccagtgac tgctgccaca accagtgtgc cgcgggctgc 720
acgggccccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc 780
aaggacacct gccccccact catgctctac aaccccacca cataccagat ggatgtgaac 840
cccgagggca aatacagctt tggtgccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg 900
gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgcggggccg acagctatga gatggaggaa 960
gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taatggaata 1020
ggtattggtg aatttaaaga cacactctcc ataaatgcta caaatattaa acacttcaaa 1080
aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc 1140
ttcacacaca ctccgcctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa 1200
atcacagggt ttttgctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgctttt 1260
gagaacctag aaatcatacg tggcaggacc aagcaacacg gtcagttttc tcttgcggtc 1320
gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag cgatggagat 1380
gtgataattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg 1440
tttgggacct ccagtcagaa aaccaaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500
gccacgggcc aggtctgcca tgccttgtgc tcccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560
agggactgcg tctcctgtca gaatgtcagc cgaggcagag aatgcgtgga caagtgcaac 1620
atcctggagg gcgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgtcaccca 1680
gaatgcctgc cccaggtcat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740
cagtgtgccc actacattga cggcccccac tgcgtcaaga cctgcccagc aggagtcatg 1800
ggagaaaaca acaccctggt ctggaagtac gcagacgccg gccacgtgtg ccacctgtgc 1860
catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggtcttg aaggctgtgc aaggaacggg 1920
cctaagatcc catccatcgc cactgggatg gtgggggccc tcctcttgct gctggtggtg 1980
gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacactgcgg 2040
aggctgctgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacgc ccagtggaga agctcccaac 2100
caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaga agatcaaagt gctgggctcc 2160
ggtgcgttcg gaactgtgta taagggactc tggatcccag aaggtgagaa agttaaaatt 2220

cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280
gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccatg tgtgccgcct gctgggcatc 2340
tgcctcacct ccaccgtgca gctcattacg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac 2400
tacgtccggg aacacaagga caatatcggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag 2460
attgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cggcgcttgg tgcaccgcga cctggcagcc 2520
aggaacgtac tggtgaaaac gccacagcat gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa 2580
ctgctgggtg cagaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640
atggcgttgg aatcaatttt acaccgaatt tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700
ggggtgaccg tttgggagtt gatgaccttt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760
agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc cccagccacc catatgtacc 2820
atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgcccaaag 2880
ttccgtgagt tgatcattga attctccaaa atggcccgag acccccagcg ctaccttgtt 2940
attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agccctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000
ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag 3060
caaggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tcctgagctc tctgagtgca 3120
actagcaaca attccactgt ggcttgcatt gatagaaatg ggctgcaaag ctgttccatc 3180
aaggaagaca gcttcttaca gcgatacagc tcagacccca caggcgcctt gactgaggac 3240
agcatagacg acaccttcct cccagtgcct gaatacataa accagtctgt tcccaaaagg 3300
cccgctggct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaaccc tgcgcccagc 3360
agagacccac actaccagga cccccacagc accgcagtgg gcaaccccga gtatctcaac 3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgctcattg ggcccagaaa 3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa 3540
gccaagccaa atggcatctt taagggctcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc 3600
gcaccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

<210> 103
<211> 1210
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 103

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

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

275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His

290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu

305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val

325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Thr Leu Ser Ile Asn

340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp

355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr

370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu

385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp

405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln

420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu

435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser

450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu

465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Ser Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu

485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro

500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Gln Asn

515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Ile Leu Glu Gly

```
    530                 535                 540
Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545                 550                 555                 560
Glu Cys Leu Pro Gln Val Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
                565                 570                 575
Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
            580                 585                 590
Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
        595                 600                 605
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
    610                 615                 620
Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Ala Arg Asn Gly
625                 630                 635                 640
Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
                645                 650                 655
Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
            660                 665                 670
Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
        675                 680                 685
Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
    690                 695                 700
Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705                 710                 715                 720
Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
                725                 730                 735
Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
            740                 745                 750
Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
        755                 760                 765
Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
    770                 775                 780
Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
```

785 790 795 800
Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
805 810 815
Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
820 825 830
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
835 840 845
Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
850 855 860
Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865 870 875 880
Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
885 890 895
Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
900 905 910
Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
915 920 925
Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
930 935 940
Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
945 950 955 960
Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
965 970 975
Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
980 985 990
Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
995 1000 1005
Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
1010 1015 1020
Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
1025 1030 1035
Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn

1040 1045 1050

Gly Leu Gln Ser Cys Ser Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg

1055 1060 1065

Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp

1070 1075 1080

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro

1085 1090 1095

Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln

1100 1105 1110

Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro

1115 1120 1125

His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln

1130 1135 1140

Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala

1145 1150 1155

Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln

1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys

1175 1180 1185

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln

1190 1195 1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala

1205 1210

<210> 104

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construto sintéticoa

<400> 104

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

1 5 10 15

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

<210> 105
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Construto sintéticoa
<400> 105

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 106

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construto sintéticoa

<400> 106

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser

115

<210> 107

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construto sintéticoa

<400> 107

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 108

<211> 621

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

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

Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn
20 25 30

Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg
35 40 45

Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr
50 55 60

Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu
65 70 75 80

Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala
85 90 95

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

Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
355 360 365
Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln
370 375 380
Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu
385 390 395 400
Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
405 410 415
Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
420 425 430
Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala
435 440 445
Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr
450 455 460
Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln
465 470 475 480
Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro
485 490 495
Lys Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val
500 505 510
Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn
515 520 525
Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn
530 535 540
Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His
545 550 555 560
Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met
565 570 575
Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
580 585 590
Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly
595 600 605

Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser
610 615 620

<210> 109
<211> 616
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Consensus sequence
<400> 109

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

180 185 190

Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys

195 200 205

His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys

210 215 220

Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys

225 230 235 240

Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn

245 250 255

Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro

260 265 270

Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly

275 280 285

Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys

290 295 300

Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu

305 310 315 320

Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys

325 330 335

Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe

340 345 350

Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu

355 360 365

Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln

370 375 380

Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu

385 390 395 400

Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val

405 410 415

Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile

420 425 430

Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala

435 440 445

Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gln Lys Thr Lys
450 455 460

Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val
465 470 475 480

Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Lys
485 490 495

Asp Cys Val Ser Cys Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys
500 505 510

Cys Asn Ile Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu
515 520 525

Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Met Asn Ile Thr Cys
530 535 540

Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
545 550 555 560

Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
565 570 575

Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
580 585 590

Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
595 600 605

Cys Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser
610 615

<210> 110
<211> 18
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 110

Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Ile Ser Ser Gly Asp Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr Trp

<210> 111

<211> 18
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 111
Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met Asp
1 5 10 15
Tyr Trp
<210> 112
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 112
Cys Ala Arg Gly Ser Asp Gly Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10 15
<210> 113
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 113
Cys Ala Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Asp Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10
<210> 114
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 114
Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10
<210> 115
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 115

Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Val Met Asp Tyr Trp
1 5 10

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 116

Cys Gln His Tyr Asn Thr Val Pro Pro Thr Phe
1 5 10

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 117

Cys Gln Gln Phe Thr Thr Ser Pro Phe Thr Phe
1 5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 118

Cys Gln His Tyr Asn Thr Val Pro Pro Thr Phe
1 5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 119

Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe
1 5 10

<210> 120

<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 120
Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe
1 5 10
<210> 121
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 121
ggaggcgctc gagacggtga ctgaggttcc ttgac 35
<210> 122
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 122
ccagccgggg cgcgccgagg tccaactgca gcaacctggg tctgagctgg tg 52
<210> 123
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 123
ccagccgggg cgcgcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactg 49
<210> 124
<211> 50

<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 124
catgggaata gctagccgac attcagatga ctcagactac atcctccctg 50
<210> 125
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 125
catgggaata gctagccgac atcgtgatga cacaagctgc attctccaat c 51
<210> 126
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 126
accgcctcca ccggcggccg cttattaaca ctctcccctg ttg 43
<210> 127
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 127
ctgggggccc ttggtgctgg ctgacgagac ggtgactgag gttc 44
<210> 128
<211> 37

<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 128
gccagcacca agggccccca ggtccaactg cagcagc 37
<210> 129
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 129
cggggccctt ggtgctggct gacgagacgg tgactgag 38
<210> 130
<211> 37
<212> DNA
<213> Iniciador da PCR
<400> 130
gccagcacca agggccccga ggtccaactg cagcaac 37
<210> 131
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 131
gtctggtgca gccacagttc gtttgatttc agcttggtg 40
<210> 132
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 132
cgaactgtgg ctgcaccaga catcgtgatg acacaagc 38
<210> 133
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 133
gtctggtgca gccacagttc gttttatttc cagcttggtc c 41
<210> 134
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 134
cgaactgtgg ctgcaccaga cattcagatg actcagacta c 41
<210> 135
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 135
tcttcgggaa gcagctatgc 20
<210> 136
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 136
ttctccactg ggcgtaagag 20
<210> 137
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 137
atctgcattc tagactggag gaaaagaaag tttgccaagg c 41
<210> 138
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 138
tactcgatga cgcgtttagg atgggatctt aggcccgttc c 41
<210> 139
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Iniciador da PCR
<400> 139
tcatgctcca ataaattcac tg 22
<210> 140
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador da PCR

<400> 140

ggagtcggcg gccgcaccat gcgaccctcc gggacgg 37

<210> 141

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador da PCR

<400> 141

gcatgtgact cgagtcatgc tccaataaat tcactgc 37