



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

(21) **PI0709917-7 A2**

(22) Data de Depósito: 29/03/2007
(43) Data da Publicação: 05/07/2011
(RPI 2113)



(51) Int.Cl.:

C07K 16/28 2006.01
A61K 39/395 2006.01
A61P 35/00 2006.01
A61P 29/00 2006.01
G01N 33/00 2006.01
C12N 15/13 2006.01
C12N 15/85 2006.01
A61K 47/48 2006.01
A61K 38/00 2006.01
A61K 31/00 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO PARA ANTICORPOS DE C-MET**

(30) Prioridade Unionista: 30/03/2006 US 60/787,556

(73) Titular(es): Novartis AG

(72) Inventor(es): Bodo Brocks, Catrin Berger, David Raymond Stover, Josef Prassler

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007007543 de 29/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/126799 de 08/11/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO PARA ANTICORPOS DE C-MET. Anticorpos e fragmentos que ligam à proteína alvo c-Met, particularmente a epítopos localizados no domínio extracelular de c-Met, são fornecidos, como adicionalmente métodos de uso dos anticorpos e kits, para tratar uma célula indesejada, em particular, uma célula associada a uma condição relacionada a c-Met tal como um câncer, uma metástase, ou uma condição inflamatória.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO PARA ANTICORPOS DE C-MET**".

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se às composições contendo anticorpos que especificamente ligam à proteína de c-Met alvo, métodos de fazer estes anticorpos, e métodos de uso para tratar condições proliferativas, tais como cânceres e metástase, e condições inflamatórias.

ANTECEDENTES

O Receptor de Fator de Crescimento Hepatócitos, aqui referido como c-Met, é um receptor de tirosina cinase que foi mostrado ser supra-expressado e/ou mutado em uma variedade de malignidades, especificamente, várias mutações de c-Met são encontradas em vários tumores de fase sólida. O ligante de c-Met, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), também conhecido como fator de difração (SF), liga a c-Met em uma via que está implicada em invasão de células tumorais e metástase (Ma et al., 2003 Cancer and Metastasis Reviews. 22:309-325).

Interação de HGF com c-Met inicia uma cascata de eventos intracelulares (Derman et al., 1996 J Biol Chem 23;271(8):4251-4255). Ligação de HGF resulta em ativação da atividade de tirosina cinase intrínseca de c-Met e autofosforilação de vários resíduos de tirosina no domínio intracelular (Ma et al., 2003 Cancer and Metastasis Reviews. 22:309-325). Ativação da via de HGF/c-Met resulta em um arranjo vasto de respostas celulares incluindo difração celular, angiogênese, proliferação, motilidade intensificada das células, invasão e metástase. Antagonismo pode atuar para inibir autofosforilação e/ou induzir internalização do cMet de superfície, e/ou infra-regular a atividade de cMet.

Células tumorais podem invadir uma fronteira de tecido, degradando e remodelando a matriz extracelular circunvizinha, de modo que as células tumorais podem migrar-se através da fronteira do tecido de matriz extracelular permitindo disseminação e formação de metástase. Sinalização de HGF/c-Met é uma via que medeia crescimento invasivo normal e maligno. Mutações de sentido contrário de c-Met foram identificadas em uma varieda

de de cânceres, com a maioria das mutações localizada no domínio de cinase. Mutantes são caracterizados por atividade de tirosina cinase aumentada assim promovendo as ações biológicas de c-Met.

- 5 Há uma necessidade por composições e métodos para tratar cânceres, metástase de cânceres e condições inflamatórias, tais como agentes que interferem com a sinalização de HGF/c-Met na qual a atividade de c-Met contribui para invasão e/ou metástase.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

- 10 A tirosina cinase de receptor c-Met está envolvida nos processos de migração, invasão e morfogénia que acompanham embriogénese e regeneração de tecido. Várias linhas de evidência indicaram que c-Met também representa um papel em patogénese de tumor. Mutações de linhagem germinal ativadoras dentro do domínio de cinase de c-Met são associadas ao desenvolvimento de carcinoma de célula renal papilar hereditária (PRCC).
- 15 Mutações dentro do domínio de cinase foram também relatadas, embora raramente, em formas esporádicas de PRCC, em carcinoma de cabeça e pescoço de célula escamosa e em carcinoma gástrico. Níveis elevados de c-Met, junto com seu único ligante HGF/SF, são observados clinicamente em frequência alta em múltiplos tumores relevantes. Uma correlação entre expressão aumentada e progressão da doença, metástase e mortalidade do
- 20 paciente foi relatada em vários cânceres, incluindo carcinoma de bexiga, mama e gástrico como também liomiossarcoma e glioblastoma.

- Anticorpos da invenção especificamente ligam c-Met com afinidade alta e modulam o efeito de c-Met da doença. Anticorpos que antagonizam níveis ou atividade de c-Met são contemplados para tratar doenças proliferativas ou doenças inflamatórias. Doenças proliferativas acreditadas tratáveis pelos anticorpos da invenção incluem especialmente cânceres. Anticorpos que agonizam níveis ou atividade de c-Met são contemplados para regeneração de órgãos, cura de ferida, regeneração de tecido, e outros.

- 30 Uma modalidade da invenção aqui fornece um anticorpo que seletivamente liga a uma proteína de c-Met, ou uma porção imunologicamente ativa deste anticorpo, ou um fragmento de anticorpo funcional. Em

uma modalidade o anticorpo ou porção imunologicamente ativa deste anticorpo é de um mamífero, tendo uma origem tal como roedor, humano ou camelídeo, ou é um anticorpo humanizado. Em uma modalidade particular, o anticorpo de anti-c-Met é caracterizado como tendo uma região de ligação de antígeno que é específica para proteína de c-Met alvo, e o anticorpo ou fragmento funcional liga c-Met ou um fragmento de c-Met. O anticorpo pode ser policlonal ou monoclonal. Em certas modalidades, o anticorpo ou porção imunologicamente ativa deste anticorpo é um anticorpo monoclonal. Outra modalidade da invenção inclui, por exemplo, um fragmento funcional, tal como uma porção de ligação de antígeno, ou um tal fragmento fornecido em um andaime ou estrutura não-tradicional ou com base em não-imunoglobulina.

Em outra modalidade, o anticorpo ou fragmento funcional deste anticorpo liga à proteína alvo, c-Met, com uma K_D de $2,0 \times 10^{-5}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-6}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-7}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-8}$ M ou menos, ou $2,0 \times 10^{-9}$ M ou menos. Em uma modalidade relacionada, o anticorpo ou fragmento funcional deste anticorpo tem uma taxa fora (K_{fora}) para proteína de c-Met alvo de $1,0 \times 10^{-2}$ por seg ou menor, $1,0 \times 10^{-3}$ por seg ou menor ou 1×10^{-4} por seg ou menor, ou $1,0 \times 10^{-5}$ por seg ou menor. Em uma modalidade relacionada, o anticorpo ou fragmento funcional deste anticorpo liga à proteína de c-Met alvo com uma K_D de $2,0 \times 10^{-5}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-6}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-7}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-8}$ M ou menos, ou $2,0 \times 10^{-9}$ M ou menos, e inibe ligação de HGF a c-Met. Em uma modalidade relacionada, o anticorpo ou fragmento funcional do mesmo antagoniza atividade de cMet.

Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento funcional deste anticorpo liga à proteína de c-Met alvo e modula, isto é, ou ativa (agoniza) ou inibe (antagoniza), atividade de c-Met, incluindo mas não limitado a fosforilação, especialmente autofosforilação. Em certas modalidades, agonismo ou ativação de fosforilação de c-Met estimula pelo menos um de uma atividade selecionada do grupo de regeneração de órgão, cura de ferida, e regeneração de tecido. Em uma modalidade relacionada, o órgão é rim, fígado, pâncreas, coração, pulmão, estômago, intestino, pele, timo, ou tireóide.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção antagonizou cMet, em que o antagonismo resulta em pelo menos uma atividade selecionada de: inibição de proliferação celular, inibição de migração de célula, inibição de sobrevivência de célula, inibição de metástase e/ou inibição de ligação de HGS ou de indução de internalização de cMet. Na maioria das modalidades, o antagonista de anticorpo de cMet da invenção pode ser usado no tratamento de uma doença proliferativa, especialmente um câncer ou doença inflamatória.

Em uma modalidade relacionada, a ligação é determinada por um ou mais ensaios que podem ser usados para medir uma atividade que é antagonismo ou agonismo pelo anticorpo. Os ensaios medem pelo menos um dos efeitos do anticorpo em uma ligação de c-Met que incluem pelo menos: indução de uma atividade da enzima da via de transdução de sinal de c-Met; indução da expressão de um gene da via de transdução de sinal de c-Met; ligação direta com base em eletroquimiluminescência a c-Met; ensaio imunoabsorvente ligado à enzima de ligar a c-Met; e proliferação, sobrevivência, migração ou metástase de uma célula. Se o anticorpo tiver um efeito antagonístico ou um agonístico é determinado comparando os resultados aos controles que carecem do ligante natural de HGF. Desse modo um anticorpo antagonístico bloqueia indução de cMet até mesmo na presença de HGF, enquanto um anticorpo agonístico causa indução na ausência de HGF.

Em outra modalidade, a invenção fornece seqüências de aminoácido e de nucleotídeo isoladas fornecendo anticorpos e a seqüência de nucleotídeo de codificação isolada selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 1-30, 73-76, e 85-88. Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece seqüências de aminoácido isoladas codificadas por estas seqüências de nucleotídeo, respectivamente, e variantes conservadoras destas seqüências de aminoácido. Em outra modalidade relacionada, a seqüência de nucleotídeo isolada de cada uma das SEQ ID NOs: 1-20 codifica uma seqüência de aminoácido de cadeia leve de ligação de antígeno. Em ainda outra modalidade relacionada, a seqüência de nucleotídeo isolada de cada uma das SEQ ID NOs: 21-30 codifica uma seqüência de aminoácido de uma cadeia pesada

de ligação de antígeno.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma seqüência de aminoácido isolada selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 31-72, 77-84, e 89-96, e variantes conservadoras destas seqüências. Em uma modalidade relacionada, a seqüência de aminoácido isolada de cada uma das SEQ ID NOs: 31-54 inclui uma cadeia leve de ligação de antígeno. Em outra modalidade relacionada, a seqüência de aminoácido isolada de cada uma das SEQ ID NOs: 55-72 inclui uma cadeia pesada de ligação de antígeno.

Em uma certa modalidade, a invenção fornece uma seqüência de aminoácido isolada tendo pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade com as SEQ ID NOs: 31-72, 77-84, e 89-96. Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece uma seqüência de nucleotídeo isolada tendo pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade com uma seqüência descrita nas SEQ ID NOs: 1-30, 73-76, e 89-96.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada de quaisquer destes anticorpos, ou um fragmento funcional de quaisquer destes anticorpos. Desse modo em certas modalidades, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia leve codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 1-20. Em modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 21-30. Em outra modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia leve codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 1-20, e uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 21-34.

Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia leve com uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 31-54. Em outra modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia pesada com uma seqüência de aminoácido sele-

cionada do grupo das SEQ ID NOs: 55-72. Em ainda outra modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia leve com uma sequência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 31-54 e variantes conservadoras destas seqüências, e
5 uma cadeia pesada com uma sequência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 55-72 e variantes conservadoras destas seqüências.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia leve de Ig lambda codificada por uma sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 73. Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo
10 uma cadeia leve de Ig capa codificada por uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 74-76.

Em uma outra modalidade, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia leve de Ig lambda com uma
15 sequência de aminoácido selecionada do grupo da SEQ ID NO: 77-80. Em outra modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia leve de Ig capa com uma sequência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 81-84.

Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo humano
20 ou humanizado isolado ou fragmento funcional do anticorpo, o anticorpo tendo uma região de ligação de antígeno que é específica para um epítopo encontrado na proteína de c-Met, de modo que o anticorpo ou fragmento funcional liga aos receptores de superfície de c-Met em uma célula, e impede ou melhora o desenvolvimento ou metástase de um câncer. Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece um anticorpo isolado ou fragmento
25 funcional tendo uma região de ligação de antígeno que é específica para um epítopo da proteína de c-Met alvo, o epítopo contendo um ou mais resíduos de aminoácido de um domínio extracelular (ECD) de c-Met. Em uma modalidade relacionada, o epítopo é um epítopo conformacional.

30 Em ainda outra modalidade, o anticorpo isolado ou fragmento funcional como descrito acima é um fragmento de anticorpo de Fab ou scFv, ou é um nanocorpo de camelídeo. O Fab ou scFv em certas modalidades

são monovalentes. A natureza monovalente do anticorpo é particularmente adequada para um agente projetado para antagonizar a proteína de c-Met. Em uma certa modalidade, quaisquer dos anticorpos de IgG é uma IgG. Em uma modalidade relacionada, quaisquer dos anticorpos acima são uma IgG1, uma IgG2, uma IgG3 ou uma IgG4. Em uma modalidade particular, a IgG é uma IgG4. Em uma modalidade mais específica, a IgG4 é codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 85-88. Em ainda outra modalidade relacionada, a IgG4 é codificada por uma seqüência de nucleotídeo tendo pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade com uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 85-88. Em uma outra modalidade relacionada, a IgG4 tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 89-96 e variantes conservadoras destas seqüências. Alternativamente, o anticorpo de anti-c-Met aqui é uma IgA, uma IgD, uma IgE ou uma IgM.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais ou variantes conservadoras destes anticorpos, e um veículo farmacêuticamente aceitável ou excipiente deste.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um animal transgênico ou uma célula transgênica portando um gene que codifica qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais deles.

Em certas modalidades, a invenção fornece um método para tratar um distúrbio ou condição relacionada a c-Met que envolve administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de qualquer uma das composições farmacêuticas acima. O distúrbio ou condição é um câncer ou uma condição inflamatória.

Em uma modalidade, o câncer é esofagiano, mama, rim incluindo mas não limitado a carcinoma de célula renal papilar, glioma, cabeça e pescoço, epitelial, pulmão, pele, leucemia, linfoma, mieloma, cérebro, pancreático, gástrico, gastrointestinal, estômago, cólon, intestino, fígado, genital, urinário, melanoma, ou próstata, como também outros tumores conhecidos a

alguém versado na técnica. Em uma modalidade particular, o câncer é de fígado, renal ou esofagiano ou é um sarcoma. Mais particularmente, o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de cérebro, câncer de estômago, câncer genital, câncer urinário, câncer de próstata, câncer de bexiga (superficial e músculo-invasivo), câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, câncer colorretal, glioma (incluindo glioblastoma, astrocitoma anaplástico, oligoastrocitoma, oligodendroglioma), câncer esofagiano, câncer gástrico, câncer gastrointestinal, câncer de fígado, carcinoma hepatocelular (HCC) incluindo HCC de infância, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço, carcinoma nasofaríngeano), carcinoma de célula de Hurthle, câncer epitelial, câncer de pele, melanoma incluindo melanoma maligno, mesotelioma, linfoma, mieloma incluindo mieloma múltiplo, leucemias, câncer de pulmão incluindo câncer de pulmão de célula não-pequena (incluindo todos os subtipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa, carcinoma broncoalveolar, carcinoma de célula grande, e tipo adenoescamoso misturado), câncer de pulmão de célula pequena, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer de próstata, câncer de rim, câncer de célula renal incluindo câncer de célula renal papilar hereditário e esporádico, Tipo I e Tipo II, e câncer de célula renal de célula clara; sarcomas, em particular osteossarcoma, sarcomas de célula clara, e sarcomas de tecido macio (incluindo rabdomiossarcomas alveolar e embrionário, sarcomas alveolares de parte macia); carcinoma de tiróide (papilares e outros subtipos).

Em uma modalidade dada, uma condição inflamatória exemplar é devido a uma infecção. Em uma modalidade, o método de tratamento seria bloquear a infecção patogênica. Em uma modalidade particular, a infecção é umas infecções bacterianas, incluindo, por exemplo, uma infecção de *Listeria*. Vide, por exemplo, Shen et al. Cell 103: 501-10, (2000). Não significando ser limitado a um mecanismo de ação, é acreditado que as bactérias usem uma proteína de ligação de c-Met para se interiorizar. Anticorpos da invenção bloqueariam esta interação, assim impedindo internalização. Em outra modalidade, o tratamento estimula uma resposta celular, por exemplo, uma

resposta curativa de ferida.

Em certas modalidades, qualquer um dos métodos acima envolve administrar também um agente quimioterapêutico. Em uma modalidade relacionada, o agente quimioterapêutico é um agente anticâncer. Combinações específicas são fornecidas ao longo do pedido de patente.

Em uma modalidade relacionada, qualquer um dos métodos acima envolve administrar também um inibidor via-específico. O inibidor via-específico pode ser um agente quimioterapêutico ou um agente biológico, por exemplo, tal como anticorpos. Inibidores via-específicos incluem, mas não são limitados a, inibidores de EGFR, VEGFR, etc.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método para tratar uma célula indesejada envolvendo contatar a célula com qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais destes anticorpos. Em uma modalidade relacionada, a célula porta c-Met na superfície da célula. Em outra modalidade relacionada, o método acima também envolve tratar a célula com um agente quimioterapêutico ou radiação.

Em uma modalidade relacionada a vários dos métodos acima, seguindo administrando ao sujeito ou contatando a célula, estes métodos podem também envolver observar melhora ou retardamento de desenvolvimento ou metástase do câncer.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método para identificar uma célula portando o receptor de superfície de c-Met, o método envolvendo contatar a célula com qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais de modo que os anticorpos ou fragmentos funcionais tenham uma marcação detectável. Por exemplo, a marcação é radioativa, fluorescente, magnética, paramagnética, ou quimioluminescente. Em uma modalidade relacionada, o método acima também envolve uma etapa de imagear ou separar a célula. Por exemplo, separar a célula é isolar a célula portando c-Met de uma população maior de células.

Em outra modalidade, o anticorpo humano ou humanizado acima ou fragmento de anticorpo é um anticorpo sintético, por exemplo, um polipeptídeo produzido por um sintetizador de aminoácido de fase sólida.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica que inclui qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais destes anticorpos e um agente terapêutico adicional. O agente terapêutico adicional é selecionado do grupo que consiste em um agente anti-
5 câncer; um antibiótico; um agente antiinflamatório; um fator de crescimento; e uma citocina.

A invenção também refere-se a um método de impedir ou tratar doenças proliferativas ou doenças, tais como um câncer, em um mamífero, particularmente um humano, com uma combinação de agentes farmacêuticos compreendendo:
10

- (a) um antagonista de c-Met da invenção; e
 - (b) um ou mais agentes farmacêuticamente ativos;
- em que pelo menos um agente farmacêuticamente ativo é um anticâncer terapêutico.

15 A invenção também refere-se às composições farmacêuticas compreendendo:

- (a) um antagonista de c-Met de anticorpo;
- (b) um agente farmacêuticamente ativo; e
- (c) um veículo farmacêuticamente aceitável;

20 em que pelo menos um agente farmacêuticamente ativo é um anticâncer terapêutico.

~~A presente invenção também refere-se a um pacote comercial ou produto compreendendo:~~

25 (a) uma formulação farmacêutica de um antagonista de c-Met de anticorpo; e

(b) uma formulação farmacêutica de um agente farmacêuticamente ativo para uso simultâneo, concorrente, separado ou seqüencial;
em que pelo menos um agente farmacêuticamente ativo é um anticâncer terapêutico.

30 Em uma certa modalidade, a invenção fornece um anticorpo isolado tendo uma primeira seqüência de aminoácido que é uma cadeia pesada tal como SEQ ID NOs: 55-72, ou uma seqüência tendo pelo menos 60, 70,

80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade de seqüência com uma seqüência selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 55-72; e uma segunda seqüência de aminoácido que é uma cadeia leve tal como SEQ ID NOs: 31-54, ou uma seqüência tendo pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 % de identidade de seqüência com uma seqüência selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 31-54.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um imunoconjugado que tem um primeiro componente que é um anticorpo ou fragmento como descrito acima e um segundo componente que é uma segunda seqüência de aminoácido. Por exemplo, o segundo composto do imunoconjugado é uma citotoxina, ou é uma proteína ligadora ou anticorpo tendo uma especificidade de ligação para um alvo que é diferente c-Met. Por exemplo, o alvo da especificidade de ligação diferente de c-Met é um antígeno de tumor ou proteína associado ao tumor em uma superfície de uma célula de câncer.

Em certas modalidades, a invenção fornece qualquer um dos anticorpos acima como um anticorpo biespecífico.

Em outra modalidade, a invenção fornece um kit que tem qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos de anticorpo. Em algumas modalidades, o kit também contém um veículo farmacologicamente aceitável ou excipiente deste. Em outras modalidades relacionadas, qualquer um dos anticorpos acima no kit estão presentes em uma dose de unidade. Em ainda outra modalidade relacionada, o kit inclui instruções para uso em administrar qualquer um dos anticorpos acima, ou fragmentos funcionais destes anticorpos, a um sujeito, ou para uso de pesquisa ou triagem.

Agentes terapêuticos que antagonizam a atividade de cMet seriam prognosticados ter um impacto benéfico em tratamento de uma gama extensiva de tumores clinicamente relevantes. Incluso na invenção estão anticorpos completamente humanos que diretamente ligam ao domínio extracelular de c-Met e bloqueia a interação com HGF/SF.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIG. 1A e 1B são alinhamentos de seqüência das cadeias de V_H da invenção, delimitando também as regiões de FR1, CDR1, FR2, CDR2,

FR3, CDR3 e FR4 de cada cadeia.

FIG. 2A e 2B são alinhamentos de seqüência das cadeias de V_L lambda da invenção, delimitando também as regiões de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4 de cada cadeia.

5 FIG. 3 é um alinhamento de seqüência das cadeias de V_L capa da invenção, delimitando também as regiões de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4 de cada cadeia.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a anticorpos isolados, particular-
 10 mente anticorpos tendo uma seqüência de aminoácido humana ou humani-
 zada que especificamente liga a c-Met, especificamente a uma porção extra-
 celular da proteína de c-Met e que inibe as propriedades funcionais de c-
 Met. Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são derivados de
 seqüências de cadeia pesada e leve particulares e/ou compreendem carac-
 15 terísticas estruturais particulares tais como regiões de CDR compreendendo
 as seqüências de aminoácido particulares. A invenção fornece anticorpos
 isolados, métodos de fazer tais anticorpos, ensaios para detectar tais anti-
 corpos, imunoconjugados e moléculas biespecíficas compreendendo tais
 anticorpos e composições farmacêuticas contendo os anticorpos, imunocon-
 20 jugados ou moléculas biespecíficas da invenção. A invenção também refere-
 se aos métodos de usar os anticorpos para inibir, isto é, antagonizar, a fun-
 ção de c-Met para inibir o desenvolvimento de um distúrbio ou condição as-
 sociada à presença de c-Met alvo de receptor celular resultando no trata-
 mento de uma doença proliferativa, por exemplo, um câncer ou uma condi-
 25 ção inflamatória. A invenção em uma modalidade diferente também refere-se
 a anticorpos que ativam, isto é, agonizam, fosforilação de c-Met, e métodos
 de uso de anticorpos agonísticos que estimulam por exemplo, regeneração
 de órgão, cura de ferida, ou regeneração de tecido.

Em uma modalidade dada, a condição inflamatória é uma infec-
 30 ção. Em uma modalidade, o método de tratamento seria bloquear a infecção
 patogênica. Em uma modalidade particular, a infecção são umas infecções
 bacterianas, incluindo, por exemplo, uma infecção de *Listeria*.

Para que a presente invenção possa ser entendida mais facilmente, certos termos são definidos ter os significados aqui, exceto quando do contrário requerido pelo contexto. Definições adicionais são expostas ao longo da descrição detalhada.

5 Um "polipeptídeo de c-Met" ou "receptor de c-Met" ou "c-Met" refere-se à tirosina cinase do receptor que liga Fator de Crescimento de Hepatócitos. Exemplos específicos incluem, por exemplo, um polipeptídeo humano codificado pela seqüência de nucleotídeo fornecida em GenBank no. de acesso. NM_000245, ou a proteína humana codificada pela seqüência de polipeptídeo fornecida em GenBank no. de acesso. NP_000236, ou o domínio extracelular dos mesmos. A proteína de precursor de cadeia simples primária é pós-translacionalmente clivada para produzir as subunidades alfas e betas que são dissulfeto ligados para formar o receptor maduro. A tirosina cinase do receptor c-Met está envolvida em processos celulares, incluindo, por exemplo, os processos de migração, invasão e morfogenia que
10 15 acompanham a embriogênese e regeneração de tecido.

A frase "distúrbio ou condição relacionada a c-Met" refere-se a qualquer doença, distúrbio ou condição que é o resultado de expressão indesejada ou carência de expressão, regulação indesejada ou carência de regulação, ou atividade indesejada ou carência de atividade, de c-Met, ou que possa ser modulada, tratada, ou curada modulando a expressão ou atividade de c-Met. Por exemplo, ativação da via de HGF/c-Met pode ser esperada em uma proporção grande de pacientes de câncer, ou em pacientes cuja doença realmente é dirigida por alterações relacionadas à via de c-Met.
20 Por exemplo, supra-regulação pode ser devido a diferentes mecanismos como supra-expressão de HGF e/ou c-Met, ou ativação constitutiva por mutação de c-Met. Um distúrbio ou condição relacionada a c-Met inclui, mas não é limitada a, por exemplo, doenças e distúrbios proliferativos e doenças e distúrbios inflamatórios. Doenças proliferativas incluem mas não são limitadas a, por exemplo, cânceres incluindo, por exemplo, gástrico, esofagiano, mama, rim incluindo carcinoma de célula renal papilar, glioma, cabeça e pescoço, epitelial, pulmão, pele, leucemia, linfoma, mieloma, cérebro, pan-
25 30

creático, gastrintestinal, estômago, intestino, cólon, fígado, genital, urinário, melanoma, e próstata, como também outros tumores conhecidos a alguém versado na técnica. Doenças inflamatórias incluem, mas não são limitadas a, por exemplo, infecção bacteriana incluindo, por exemplo, por *Listeria*. Outros

5 distúrbios são descritos aqui e, por exemplo, em Online Mendelian Inheritance in Man ("OMIM") entradas para, por exemplo, Proto-oncogene de Met em OMIN no. de acesso 164860 e para Fator de Crescimento de Hepatócitos / Fator de Difração em OMIM no. de acesso 142409. Outros exemplos serão conhecidos àqueles versados na técnica, por exemplo, como revisado por

10 Corso et al., *TRENDS in Mol. Med.* 11(6): 2841 (2005) e Christensen et al., *Cancer Letts.* 225: 1-26 (2005), ambos destes são incorporados por referência.

O termo "resposta imune" refere-se a qualquer atividade de linfócitos, células de apresentação de antígeno, células fagocitárias, granulócitos, e macromoléculas solúveis produzidas por estas células ou pelo fígado

15 (incluindo produção e/ou secreção de anticorpos, citocinas, e complemento) que resulta em ligação seletiva para, danificação, destruição, ou eliminação do corpo humano da invasão por patógenos, células ou tecidos infetados com patógenos, células cancerosas, ou, em casos de autoimunidade ou inflamação patológica, células humanas ou tecidos normais.

20

Uma "via de transdução de sinal" refere-se a uma relação causal bioquímica em geral iniciada por uma interação de proteína-proteína tal como ligação de um fator de crescimento a um receptor, resultando em transmissão de um sinal de uma porção de uma célula para outra porção de uma

25 célula. Em geral, a transmissão envolve fosforilação específica de um ou mais resíduos de tirosina, serina, ou treonina em uma ou mais proteínas na série de reações que causam transdução de sinal. Os penúltimos processos tipicamente incluem eventos nucleares, resultando em uma alteração na expressão de gene.

30 Um "receptor de superfície" inclui, por exemplo, moléculas e complexos moleculares capazes de receber um sinal e capazes da transmissão de um tal sinal ao longo da membrana plasmática de uma célula. Um

exemplo de um receptor de superfície de célula da presente invenção é c-Met ao qual uma molécula de proteína de fator de crescimento se liga por exemplo, um fator de crescimento de hepatócitos (HGF).

O termo "anticorpo" abrange qualquer metade que tem função de ligação semelhante à imunoglobulina. O termo inclui moléculas de anticorpo inteiras e qualquer fragmento de ligação de antígeno (isto é, "porção de ligação de antígeno") ou cadeias simples dos mesmos, anticorpos de camélídeo incluindo, por exemplo, nanocorpos, construções de ligação de exibição de fago, e outros. Um anticorpo de ocorrência natural é uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Há apenas dois tipos de cadeia leve: lambda e kappa. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, C_L . As regiões de V_H e V_L podem ser também subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade (CDR), entremeadas com as regiões que são conservadas mais, denominadas regiões de estrutura (FR). Como se encontra na natureza, cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs dispostas do término amino para o término carboxi na ordem a seguir: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina para hospedar tecidos ou fatores, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico. Um anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal.

O termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de antígeno") refere-se a comprimento total ou um ou

mais fragmentos de um anticorpo tendo a habilidade para especificamente ligar a um antígeno (por exemplo, uma porção de c-Met). Foi mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser executada por fragmentos de uma molécula de anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação contendo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo incluem um fragmento de Fab, que é um fragmento monovalente que consiste nos domínios de V_L , V_H , C_L e $CH1$; um fragmento de $F(ab)_2$, que é um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos de Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; um fragmento de Fd tendo os domínios de V_H e $CH1$; um fragmento de Fv tendo os domínios de V_L e V_H de uma seqüência de aminoácido simples de uma cadeia de anticorpo; um fragmento de dAb (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546) tendo um domínio de V_H ; e uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR).

Referência a uns fragmentos de anticorpo que contêm as porções de ligação de antígeno pode contemplar o fragmento isolado ou conjugado às metades químicas ou biológicas, ou aos fragmentos ligados às estruturas ou andaimes derivados de imunoglobulina não-tradicionais, incluindo mas não limitados a, por exemplo, ancirinas, fibronectinas, anticorpos de domínio, lipocalina, imunofarmacêuticos modulares pequenos, maxicorpos, nanocorpos, proteína A, afilina, gama-cristalina e ubiquitina, e outros andaimes contemplados conhecidos a alguém versado na técnica.

Além disso, embora em uma molécula de anticorpo de ocorrência natural haja duas cadeias tendo domínios de Fv, V_L e V_H que são codificados através de genes separados, eles podem ser unidos usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que os permite ser recombinantemente expressos como uma cadeia de proteína simples em que as regiões de V_L e V_H formam uma molécula monovalente (conhecida como Fv de cadeia simples (scFv); vide por exemplo, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; e Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia simples são também abrangidos dentro do termo porção de ligação de antígeno de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são ob-

tidos usando técnicas convencionais conhecidas àqueles de habilidade na técnica, e os fragmentos são triados para utilidade da mesma maneira que são os anticorpos intactos ou outros fragmentos dos mesmos.

Um "anticorpo isolado" refere-se a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente liga a um determinante que é um conjunto de aminoácidos em c-Met é substancialmente livre de anticorpos que especifica e substancialmente ligam a antígenos diferentes de c-Met). Um anticorpo isolado que especificamente liga a uma proteína de c-Met tal como c-Met humano, pode, porém, ter reatividade cruzada para outros antígenos, tais como para moléculas de c-Met de outras espécies, ou para proteínas tendo uma quantidade alta de homologia a uma sequência de aminoácido de c-Met humana. Além disso, um anticorpo isolado pode estar substancialmente livre de outro material celular e/ou químicas.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpo, todas estas compartilham uma composição molecular simples. Uma composição de anticorpo monoclonal desse modo exibe uma especificidade de ligação simples e afinidade para um epítipo particular.

Como aqui usado, o termo "anticorpo policlonal" refere-se a uma composição de anticorpo tendo uma população de anticorpo heterogênea. Anticorpos policlonais são freqüentemente derivados do soro agrupado de animais imunizados ou de humanos selecionados.

O termo "anticorpo humano", como aqui usado, é intencionado incluir anticorpos tendo regiões variáveis em que pelo menos uma e em geral a estrutura e regiões de CDR são derivadas de seqüências de origem humana. Além disso, se o anticorpo contiver uma região constante, a região constante também é derivada de tais seqüências humanas, por exemplo, seqüências de linhagem germinal humana, ou versões mutadas de seqüências de linhagem germinal humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por seqüências humanas (por exemplo, mutações tais como substituições introduzidas por mu-

tagênese aleatória ou loco-específica in vitro ou através de mutação somática in vivo).

O termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a anticorpos que exibem uma especificidade de ligação simples tendo regiões variáveis em que a estrutura e regiões de CDR são derivadas de seqüências humanas. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não-humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada, em geral de origem humana, e um transgene de cadeia leve, em geral de origem humana, fundido em uma célula imortalizada, em geral de origem humana.

O termo "anticorpo humano recombinante", como aqui usado, inclui anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados através de meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado deles, anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo humano, por exemplo, de um transfectoma, anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpo humano recombinante, combinatório, e anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva corte de toda ou uma porção de uma ou mais seqüências de gene de imunoglobulina humana para outras seqüências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis em que a estrutura e regiões de CDR são derivadas de seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana. Em certas modalidades, porém, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos à mutagênese in vitro (ou, quando um animal transgênico para seqüências de Ig humana for usado em mutagênese somática in vivo), de forma que as seqüências de aminoácido das regiões de V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são seqüências que, embora derivadas e relacionadas às seqüências de V_H e V_L de linhagem germinal humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório de linhagem germinal de anticorpo humano in vivo.

Como aqui usado, "isótipo" refere-se à classe de anticorpo (por exemplo, IgA, IgD, IgM, IgE, ou IgG tal como IgG1, uma IgG2, uma IgG3 ou IgG4) que é fornecido pelos genes de região constante de cadeia pesada.

As frases "um anticorpo que reconhece um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" é usado alternadamente aqui com o termo "um anticorpo que especificamente liga a um antígeno".

Como aqui usado, um anticorpo que "especificamente liga a c-Met humano" é intencionado referir-se a um anticorpo que liga a c-Met humano com uma K_D de $2,0 \times 10^{-5}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-6}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-7}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-8}$ M ou menos, ou $2,0 \times 10^{-9}$ M ou menos. Como aqui usado, o termo "reatividade cruzada" refere-se a um anticorpo ou população de anticorpos que ligam a epítomos em outros antígenos. Isto pode ser causado por avidez ou especificidade baixas do anticorpo ou por antígenos distintos múltiplos tendo identidade ou epítomos bem parecidos. Reatividade cruzada às vezes é desejável quando se quer ligação geral a um grupo relacionado de antígenos ou ao tentar marcação de espécies cruzadas se a sequência de epítopo de antígeno não for altamente conservada em evolução.

Um anticorpo que "reage cruzado com um antígeno diferente de c-Met humano" refere-se a um anticorpo que liga àquele antígeno com uma K_D de $0,5 \times 10^{-7}$ M ou menos, 5×10^{-8} M ou menos, ou 2×10^{-9} M ou menos. Um anticorpo que "não reage cruzado com um antígeno particular" é intencionado a referir-se a um anticorpo que liga àquele antígeno, se é que, com uma K_D de $1,5 \times 10^{-8}$ M ou mais, ou uma K_D de $5-10 \times 10^{-7}$ M ou 5×10^{-6} M ou mais. Em certas modalidades, tais anticorpos que não reagem cruzado com o antígeno exibindo essencialmente ligação indetectável contra estas proteínas em ensaios de ligação padrões.

Como aqui usado, um anticorpo que "inibe ligação a c-Met" refere-se a um anticorpo que inibe ligação de ligante de HGF/SF ao receptor de superfície de c-Met com uma K_i de 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 1 nM ou menos, 0,75 nM ou menos, 0,5 nM ou menos, ou 0,25 nM ou menos.

Como aqui usado, um anticorpo que "inibe atividade de c-Met de transdução de sinal" é intencionado referir-se a um anticorpo que inibe ativi-

dade proliferativa induzida por c-Met ou outra atividade induzida com um IC₅₀ menos que 10 nM, 5 nM, 2,5 nM, 1,0 nM, 0,5 nM, ou menos.

O termo "K_{assoc}" ou "K_a", como aqui usado, é intencionado referir-se à taxa de associação de uma interação de anticorpo-antígeno particular, e o termo "K_{Dis}" ou "K_D", como aqui usado, é intencionado referir-se à taxa de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular. O termo "K_D", como aqui usado, é intencionado a referir-se à constante de dissociação que é obtida da razão de K_D a K_a (isto é K_D/K_a) e é expressado como uma concentração molar (M). Valores de K_D para anticorpos podem ser determinados usando métodos bem estabelecidos na técnica. Um método para determinar a K_D de um anticorpo é usar ressonância de plasmon de superfície, ou usar um sistema de biossensor tal como um sistema de Biacore®.

Como aqui usado, o termo "anticorpo de agonista" ou "anticorpo de ativação" é intencionado a referir-se a um anticorpo que aumenta uma ou mais atividades induzidas por c-Met em pelo menos 20 %-40 % quando adicionado a uma célula, tecido ou organismo que expressa c-Met. Em algumas modalidades, o anticorpo ativa a atividade de c-Met em pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % ou mais que 100 %. Em algumas modalidades, um anticorpo de agonista da invenção aumenta pelo menos uma atividade de c-Met em 10 vezes. Em geral, este aumento é observado na ausência do indutor biológico, HGF. Porém, em algumas modalidades, tais como em um controle para um ensaio, o anticorpo ativador é adicionado na presença de HGF.

Como aqui usado, o termo "afinidade" refere-se à resistência de interação entre o anticorpo e uma porção do antígeno conhecida como o "epítipo", em um sítio antigênico simples. Dentro de cada sítio antigênico, a região variável do "braço" do anticorpo interage através de forças não-covalentes fracas com o antígeno em numerosas localizações atômicas ou átomos de resíduo de aminoácido do anticorpo; em geral, o quanto maior o número de tais interações, mais forte a afinidade do anticorpo para o antígeno.

Como aqui usado, o termo "avidez" refere-se a uma medida informativa da estabilidade ou resistência geral do complexo de anticorpo-antígeno. É controlada através de três fatores principais: afinidade de anticorpo-epítopo; a valência de cada um do antígeno e anticorpo; e o arranjo estrutural ou configuração tridimensional destas partes interagentes. Por fim estes fatores definem a especificidade do anticorpo que é a probabilidade que o anticorpo particular liga a um epítopo de antígeno preciso e a estabilidade e duração da ligação.

Para obter uma sonda tendo uma avidez mais alta, um conjugado dimérico (duas moléculas de uma proteína de anticorpo ou polipeptídeo acopladas a um marcador de FACS) pode ser construído, desse modo fazendo interações de afinidade baixa (tais como com um anticorpo de linhagem germinal) mais facilmente detectadas por FACS. Outro meio para aumentar a avidez de ligação de antígeno envolve gerar dímeros ou multímeros de quaisquer das construções descritas aqui dos anticorpos de c-Met. Tais multímeros podem ser gerados através de ligação covalente entre módulos individuais, por exemplo, imitando a ligação natural do término C-ao-N ou imitando os dímeros de anticorpo que são unidos através de suas regiões constantes. As ligações engenheiradas na interface de Fc/Fc podem ser covalentes ou não-covalentes. Além disso, pares de dimerização ou multimerização diferentes de Fc podem ser usados na construção de híbridos de anticorpo de anti-c-Met tais como anticorpos bi-funcionais, para aumentar tais estruturas de ordem mais alta.

Como aqui usado, o termo "afinidade alta" para um anticorpo de IgG refere-se a um anticorpo tendo uma K_D de 10^{-8} M ou menos, 10^{-9} M ou menos, ou 10^{-10} M ou menos para um antígeno alvo. Porém, ligação de "afinidade alta" pode variar para outros isótipos de anticorpo. Por exemplo, ligação de "afinidade alta" para um isótipo de IgM refere-se a um anticorpo tendo uma K_D de 10^{-7} M ou menos, ou 10^{-8} M ou menos.

Como aqui usado, o termo "sujeito" inclui qualquer mamífero, incluindo um humano, ou um mamífero não-humano, ou outro animal.

O termo "animal não-humano" inclui todos os vertebrados, por

exemplo, mamíferos, tais como primatas não-humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, e não-mamíferos tais como pássaros, anfíbios, répteis, etc.

O termo, "otimizado" significa que uma seqüência de nucleotídeo foi alterada para codificar uma seqüência de aminoácido usando códons que são preferidos na célula ou organismo de produção, em geral uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de uma levedura tal como *Pichia*, uma célula mamífera tal como célula de Hamster Ovário Chinês (CHO) ou uma célula humana. A seqüência de nucleotídeo otimizada é engenheirada para reter completamente ou tanto quanto possível a seqüência de aminoácido codificada pela seqüência de nucleotídeo de partida original que é também conhecida como a seqüência "parental". As seqüências otimizadas aqui foram engenheiradas para ter códons com as seqüências de nucleotídeo que são preferidas em células humanas, expressão porém otimizada destas seqüências em outras células eucarióticas são também visadas aqui. As seqüências de aminoácido dos anticorpos aqui codificados através das seqüências de nucleotídeo otimizadas são também referidas como otimizadas.

Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas subseções a seguir.

Ensaio padrão para avaliar a habilidade de ligação dos anticorpos para c-Met de várias espécies são conhecidos na técnica, incluindo por exemplo, ELISAs, western blot e RIAs. Ensaios adequados são conhecidos aos versados na técnica. Vide, por exemplo, F. Ausubel, et al., ed. 2006, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nova Iorque. A cinética de ligação (por exemplo, afinidade de ligação) dos anticorpos também pode ser avaliada por ensaios padrões conhecidos na técnica, tais como por análise de Biacore. Ensaios para avaliar os efeitos dos anticorpos sobre as propriedades funcionais de c-Met (por exemplo, induzindo internalização do receptor, inibindo ligação do fator de crescimento a c-Met, inibindo autofosforilação de cMet, inibindo ativação da via de cMet, assim impedindo ou melhorando a proliferação, ou ensaios de cinase) são descritos em aqui.

Conseqüentemente, um anticorpo que "inibe" uma ou mais destas propriedades funcionais de c-Met (por exemplo, bioquímicas, imunoquímicas, atividades biológicas celulares, fisiológicas ou outras, ou outras) como determinado de acordo com as metodologias conhecidas na técnica e descritas aqui, refere-se a um antagonismo estatisticamente significativo ou diminuição na atividade particular com relação àquela vista na ausência do anticorpo (por exemplo, ou na presença de um anticorpo de controle de especificidade irrelevante). Um anticorpo que inibe os efeitos da atividade de c-Met tal como diminuição estatisticamente significativa em pelo menos 10 % do parâmetro medido, por pelo menos 50 %, 80 % ou 90 %, e em certas modalidades um anticorpo da invenção pode inibir mais que 95 %, 98 % ou 99 % da atividade funcional de c-Met. Em geral, a diminuição da atividade é medida seguindo um evento de indução, tal como adição de HGF.

Alternativamente, um anticorpo que "agoniza" uma ou mais destas propriedades funcionais de c-Met (por exemplo, bioquímicas, imunoquímicas, atividades biológicas celulares, fisiológicas ou outras, ou outras) como determinado de acordo com as metodologias conhecidas na técnica e descritas aqui, refere-se a um aumento estatisticamente significativo na atividade particular com relação àquele visto na ausência do anticorpo (por exemplo, ou na presença de um anticorpo de controle de especificidade irrelevante). Um anticorpo que estimula ou agoniza os efeitos da atividade de c-Met tal como aumento estatisticamente significativo em pelo menos 10 % do parâmetro medido, por pelo menos 50 %, 80 % ou 90 %, e em certas modalidades um anticorpo da invenção pode agonizar mais que 95 %, 98 % ou 99 % ou mais, da atividade de c-Met funcional.

ANTICORPOS RECOMBINANTES

Anticorpos da invenção são os anticorpos recombinantes, isolados e estruturalmente caracterizados como descritos nos Exemplos. As seqüências de nucleotídeos de V_H dos anticorpos são mostradas nas SEQ ID NOs: 21-30 respectivamente. Tabelas C-E fornecem exemplos de seqüências de nucleotídeo de V_H de anticorpos diferentes da invenção. As seqüências de nucleotídeo de V_L dos anticorpos são mostradas nas SEQ ID NOs: 1-

20 respectivamente. (Tabelas C-E fornecem exemplos de seqüências de nucleotídeo de V_L de anticorpos diferentes da invenção). As seqüências de nucleotídeo de cadeia leve de Ig lambda e capa dos anticorpos são mostradas nas SEQ ID NOs: 73-76 e nas Tabelas C-E. As seqüências de nucleotídeo de IgG4 dos anticorpos são mostradas nas SEQ ID NOs: 85-88 e nas Tabelas C-E. Outros anticorpos da invenção incluem nucleotídeos que foram mutados, ainda têm pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade com as seqüências descritas acima.

As seqüências de aminoácido de V_H dos anticorpos são mostradas nas SEQ ID NOs: 55-72 respectivamente e nas Tabelas A-B e E. As seqüências de aminoácido de V_L dos anticorpos são mostradas nas SEQ ID NOs: 31-54 respectivamente e nas Tabelas A-B e E. As seqüências de aminoácido de cadeia leve de Ig lambda são mostradas nas SEQ ID NOs: 77-80 respectivamente e nas Tabelas A-B e E. As seqüências de aminoácido de cadeia leve de Ig capa dos anticorpos são mostradas nas SEQ ID NOs: 81-84 respectivamente e nas Tabelas A-B e E. As seqüências de aminoácido de IgG4 dos anticorpos são mostradas nas SEQ ID NOs: 89-96 respectivamente e nas Tabelas A-B e E. Anticorpos adicionais da invenção incluem aminoácidos que foram mutados, e retém pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade com as seqüências descritas acima.

Uma vez que cada um destes anticorpos pode ligar a um sítio em uma porção extracelular de c-Met, a V_H / V_L (seqüências de nucleotídeo e seqüências de aminoácido), $V_H /$ cadeia leve de Ig lambda (seqüências de nucleotídeo e seqüências de aminoácido), e $V_H /$ cadeia leve de Ig capa (seqüências de nucleotídeo e seqüências de aminoácido) podem ser "misturadas e emparelhadas" para dar combinações adicionais de moléculas de ligação de anti-c-Met da invenção. Ligação de c-Met de tais anticorpos pode ser testada usando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por exemplo, ELISAs). As seqüências de V_H , V_L , cadeia leve de Ig lambda, e cadeia leve de Ig capa dos anticorpos da presente invenção são particularmente tratáveis para combinações novas, uma vez que estes anticorpos usam seqüências de V_H , V_L , cadeia leve de Ig lambda, e cadeia leve de Ig

capa derivadas das mesmas seqüências de linhagem germinal ou similares e desse modo exibem similaridade estrutural.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo tendo pelo menos: uma região variável de cadeia pesada (V_H) compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 55-72; e uma região variável de cadeia leve (V_L) compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 31-54; em que o anticorpo especificamente liga c-Met.

Exemplos de combinações de cadeia pesada e leve incluem pelo menos: uma V_H da SEQ ID NO: 65 e uma V_L da SEQ ID NO: 32; ou uma V_H da SEQ ID NO: 66 e uma V_L da SEQ ID NO: 34; ou uma V_H da SEQ ID NO: 67 e uma V_L da SEQ ID NO: 37; ou uma V_H da SEQ ID NO: 68 e uma V_L da SEQ ID NO: 38; ou uma V_H da SEQ ID NO: 69 e uma V_L da SEQ ID NO: 51; ou uma V_H da SEQ ID NO: 70 e uma V_L da SEQ ID NO: 52; ou uma V_H da SEQ ID NO: 71 e uma V_L da SEQ ID NO: 53; ou uma V_H da SEQ ID NO: 72 e uma V_L da SEQ ID NO: 54; ou uma V_H da SEQ ID NO: 55 e uma V_L da SEQ ID NO: 31; ou uma V_H da SEQ ID NO: 58 e uma V_L da SEQ ID NO: 36; ou uma V_H da SEQ ID NO: 61 e uma V_L da SEQ ID NO: 41; ou uma V_H da SEQ ID NO: 62 e uma V_L da SEQ ID NO: 45. Tabelas A-B ilustram exemplos de emparelhamentos "misturados e emparelhados" de seqüências de aminoácido de V_H e V_L de anticorpos diferentes da invenção. Figs. 1-3 são tabelas que ilustram exemplos de uma seqüência de aminoácido de V_H e V_L que ilustra regiões de FR e de CDR que podem ser fornecidas em andaimes alternativos para fornecer construções tendo a mesma atividade antagonística de cMet ou similar que os anticorpos aqui.

Conseqüentemente, em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo tendo pelo menos: uma região de V_H que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 55-72 e uma cadeia leve de Ig lambda que compreendem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 77-80, em que o

anticorpo especificamente liga c-Met.

Exemplos de combinações de V_H / cadeia leve de Ig lambda incluem pelo menos: uma V_H da SEQ ID NO: 66 e uma cadeia leve de Ig lambda da SEQ ID NO: 77; ou uma V_H da SEQ ID NO: 65 e uma cadeia leve de Ig lambda da SEQ ID NO: 78; ou uma região de V_H que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 69, uma cadeia leve de Ig lambda da SEQ ID NO: 79; ou uma região de V_H da SEQ ID NO: 70 e uma cadeia leve de Ig lambda da SEQ ID NO: 80.

Conseqüentemente, em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo tendo pelo menos: uma região de V_H que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 55-72 e uma cadeia leve de Ig capa que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 81-84 em que o anticorpo especificamente liga c-Met.

Exemplos de combinações de V_H / cadeia leve de Ig capa incluem pelo menos: uma região de V_H da SEQ ID NO: 71 e uma cadeia leve de Ig capa da SEQ ID NO: 81; ou uma região de V_H da SEQ ID NO: 68 e uma cadeia leve de Ig capa da SEQ ID NO: 82; ou uma região de V_H da SEQ ID NO: 67 e uma cadeia leve de Ig capa da SEQ ID NO: 83; ou uma região de V_H da SEQ ID NO: 72 e uma cadeia leve de Ig capa da SEQ ID NO: 84.

Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo tendo pelo menos: uma cadeia de V_H que compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 21-30 e uma cadeia de V_L que compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1-20.

Desse modo exemplos de combinações de cadeia pesada e leve incluem pelo menos: uma região de V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 21 e uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 1; ou uma região de V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 24 e uma regi-

5 ão variável de cadeia leve que compreende a seqüência de nucleotídeo da
 SEQ ID NO: 6; ou uma região de V_H que compreende a seqüência de nucle-
 otídeo da SEQ ID NO: 27 e uma região variável de cadeia leve que compre-
 10 ende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 11; ou uma região de V_H
 que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 28 e uma regi-
 ão variável de cadeia leve que compreende a seqüência de nucleotídeo da
 SEQ ID NO: 15; ou uma região de V_H que compreende a seqüência de nu-
 cleotídeo da SEQ ID NO: 29 e uma região variável de cadeia leve que com-
 preende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 18; ou uma região de
 15 V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 30 e uma
 região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de nucleotídeo
 da SEQ ID NO: 20; ou uma região de V_H que compreende a seqüência de
 nucleotídeo da SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia leve que
 compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 1; ou uma região
 20 de V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 23 e
 uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de nucleo-
 tídeo da SEQ ID NO: 1; ou uma região de V_H que compreende a seqüência
 de nucleotídeo da SEQ ID NO: 24 e uma cadeia leve, região variável que
 compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 7; ou uma região
 25 de V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 24 e
 uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de nucleo-
 tídeo da SEQ ID NO: 8; ou uma região de V_H que compreende a seqüência
 de nucleotídeo da SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia leve que
 compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 9; ou uma região
 30 de V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 24 e
 uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de nucleo-
 tídeo da SEQ ID NO: 10. Vide A-B que ilustram exemplos de emparelhamen-
 tos "misturados e emparelhados" de seqüências de nucleotídeo de V_H e V_L
 de anticorpos diferentes da invenção para exemplos adicionais de empare-
 lhamentos de seqüências de nucleotídeo V_H e V_L .

Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo recombinan-
 te isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo tendo pelo menos:

uma cadeia de V_H que compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 21-30 e uma cadeia leve de Ig lambda que compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 73.

5 Desse modo um exemplo de uma combinação de V_H / cadeia leve de Ig lambda inclui: uma região de V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 23 e uma cadeia leve de Ig lambda que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 73.

10 Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo tendo pelo menos: uma cadeia de V_H que compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 21-30 e uma cadeia leve de Ig capa que compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 74-76.

15 Desse modo exemplos de combinações de V_H e cadeia leve de Ig capa incluem pelo menos: uma região de V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia leve de Ig capa que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 74; ou uma região de V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 25 e uma região variável de cadeia leve de Ig capa que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 75; ou uma região de V_H que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 27 e uma região variável de cadeia leve de Ig capa que compreende a seqüência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 76.

25 Como aqui usado, um anticorpo humano compreende regiões variáveis de cadeia pesada ou leve que são "o produto de" ou "derivadas de" uma seqüência de linhagem germinal particular se as regiões variáveis do anticorpo forem obtidas de um sistema que usa genes de imunoglobulina de linhagem germinal humana. Tais sistemas incluem imunizar um camundongo transgênico portando genes de imunoglobulina humana com o antígeno de interesse, ou triar uma biblioteca de genes de imunoglobulina humana exibida em fago com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano do qual é o

30

produto ou derivado de uma seqüência de imunoglobulina de linhagem germinal humana pode ser identificado como tal comparando a seqüência de aminoácido do anticorpo humano às seqüências de aminoácido de imunoglobulinas de linhagem germinal humana e selecionando a seqüência de

5 imunoglobulina de linhagem germinal humana que está na seqüência mais íntima (isto é, maior % de identidade) à seqüência do anticorpo humano. Um anticorpo humano do qual é o produto ou derivado de uma seqüência de imunoglobulina de linhagem germinal humana particular pode conter diferenças de aminoácido quando comparado à seqüência de linhagem germinal.

10 Tais diferenças são devido a, por exemplo, pelo menos umas mutações somáticas de ocorrência natural ou uma introdução intencionalmente de mutação loco-dirigida. Porém, um anticorpo humano selecionado é tipicamente pelo menos 90 % idêntica em seqüência de aminoácidos a uma seqüência de aminoácido codificada por um gene de imunoglobulina de linhagem germinal humana e contém resíduos de aminoácido que identificam o anticorpo

15 humano como sendo de origem humana quando comparado às seqüências de aminoácido de linhagem germinal de imunoglobulina de outras espécies (por exemplo, seqüências de linhagem germinal murina). Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, ou pelo menos 95 %, ou até mesmo pelo menos 96 %, 97 %, 98 %, ou 99 % de identidade em seqüência de aminoácido à seqüência de aminoácido codificada

20 por um gene de imunoglobulina de linhagem germinal. Tipicamente, um anticorpo humano derivado de uma seqüência de linhagem germinal humana particular exibirá não mais que 10 diferenças de aminoácido da seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linhagem germinal

25 humana. Em certos casos, o anticorpo humano pode exibir não mais que 5, ou até mesmo não mais que 4, 3, 2, ou 1 diferenças de aminoácido da seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linhagem germinal.

30 ANTICORPOS DE IDENTIDADE

Em ainda outra modalidade, um anticorpo da invenção tem pelo menos seqüências de nucleotídeo de cadeia pesada e leve de região variá-

vel, ou seqüências de aminoácido de cadeia pesada e leve de região variável, ou seqüências de nucleotídeo de Ig lambda, ou seqüências de aminoácido de Ig lambda, ou seqüências de nucleotídeo de Ig capa, ou seqüências de aminoácido de Ig capa ou seqüências de nucleotídeo de IgG4, ou seqüências de aminoácido de IgG4 que têm homologia ou identidade às seqüências de aminoácido e nucleotídeo dos anticorpos descritos aqui, e em que os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos de anti-c-Met da invenção, isto é, demonstram a atividade ou atividades funcionais parentais. As atividades funcionais parentais podem ser antagônicas ou agonísticas. Na maioria das modalidades, a atividade é antagônica.

Por exemplo, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, tendo uma região de V_H e uma região variável de cadeia leve, de modo que a região de V_H compreende uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 99 % de identidade a uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 55-72, a região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 99 % de identidade a uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 31-54, em que o anticorpo especificamente liga a c-Met e o anticorpo apresenta pelo menos uma das seguintes propriedades antagônicas-funcionais: o anticorpo induz internalização do receptor de cMet ou o anticorpo inibe ligação de um fator de crescimento de proteína para c-Met, ou o anticorpo inibe autofosforilação de c-Met assim impedindo ativação da via de c-Met, ou o anticorpo inibe supra-regulação da via de cMet que é o resultado da transdução de sinal, ou o anticorpo inibe ligação de c-Met, assim impedindo ou melhorando proliferação celular, sobrevivência, migração, invasão ou alterações na morfologia, e especialmente impedindo ou melhorando câncer tal como crescimento de tumor e ou metástase.

Em uma modalidade alternativa, o anticorpo é responsivo e ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular. Em uma modalida-

de, a resposta celular é uma resposta curativa de ferida.

Em um exemplo adicional, a invenção fornece um anticorpo re-combinante isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, tendo uma cadeia leve de Ig lambda de modo que a cadeia leve de Ig lambda compre-
5 ende uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80 % de identidade a uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 77-80. Em outras modalidades, o anticorpo liga especificamente a c-Met, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo ativa induz internalização do receptor de cMet, o anticor-
10 po inibe ligação de um fator de crescimento de proteína a c-Met, com tal ini-bição assim impedindo ativação do receptor, por exemplo, impedindo supra-regulação de via resultante de ativação de cMet e/ou transdução de sinal, ou o anticorpo impedindo ou melhorando proliferação celular, sobrevivência ce-lular, migração, invasão ou alterações em morfologia, ou o anticorpo antago-
15 nizando atividade de c-Met, assim impedindo ou melhorando câncer tal co-mo crescimento de tumor e ou metástase.

Em uma modalidade alternativa, o anticorpo ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

Em outro exemplo, a invenção fornece um anticorpo recombi-
20 nante isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, tendo uma ca-deia leve de Ig capa em que: a cadeia leve de Ig capa tem uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80 % de identidade a uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 81-84; o anticorpo especificamente liga a c-Met, e o anticorpo apresenta pelo menos
25 um das propriedades funcionais fornecidas acima e ao longo do relatório descritivo. Em uma modalidade alternativa, o anticorpo ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo recom-binante isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo em que o anti-
30 corpo é uma IgG4 de modo que a IgG4 tem uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80 % de identidade a uma seqüência de aminoácido sele-cionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 89-96; o anticorpo especifi-

camente liga a c-Met, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir fornecidas acima e ao longo do relatório descritivo. Em uma modalidade alternativa, o anticorpo é agonístico, e ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

5 Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três ou mais das propriedades funcionais antagonísticas debatidas aqui. O anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico.

10 Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, tendo uma região de V_H e uma região variável de cadeia leve, de modo que a região de V_H é codificada por uma seqüência de nucleotídeo que é pelo menos 80 % de identidade a uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que
15 consiste nas SEQ ID NOs: 21-30; a região variável de cadeia leve é codificada por uma seqüência de nucleotídeo que é pelo menos 80 % de identidade a uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1-20; o anticorpo codificado especificamente liga a c-Met, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais fornecidas acima e ao longo do relatório descritivo. Em uma modalidade alternati-
20 va, o anticorpo ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

— — — — — Em um outro exemplo, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, tendo uma cadeia leve de Ig lambda de modo que a cadeia leve de Ig lambda codificada
25 por uma seqüência de nucleotídeo que é pelo menos 80 % de identidade a uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste da SEQ ID NO: 73; o anticorpo codificado especificamente liga a c-Met, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais fornecidas acima e ao longo do relatório descritivo. Em uma modalidade alternativa, o anticorpo
30 é agonístico e ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

Em outro exemplo, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, tendo uma ca-

deia leve de Ig capa em que: a cadeia leve de Ig capa codificada por uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80 % de identidade a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 74-76; o anticorpo especificamente liga a c-Met, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais fornecidas acima e ao longo do relatório descritivo. Em uma modalidade alternativa, o anticorpo ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo em que o anticorpo é uma IgG4 em que a IgG4 é codificada por uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80 % de identidade a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 85-88; o anticorpo codificado especificamente liga a c-Met, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais fornecidas acima e ao longo do relatório descritivo. Em uma modalidade alternativa, o anticorpo é agonístico, e ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três das propriedades funcionais antagonísticas debatidas aqui. O anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico.

Em outras modalidades, as seqüências de aminoácido de V_H e/ou V_L podem ser 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade às seqüências expostas acima. Um anticorpo tendo regiões de V_H e V_L tendo identidade alta (isto é, 80 % ou mais) às regiões de V_H e V_L das SEQ ID NOs: 31-72 respectivamente, pode ser obtido através de mutagênese (por exemplo, mutagênese loco-dirigida ou mediada por PCR) das moléculas de ácido nucléico que codificam as SEQ ID NOs: 31-72, seguido testando o anticorpo alterado codificado para a função retida (isto é, as funções expostas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Em outras modalidades, as regiões variáveis de seqüências de nucleotídeo de cadeia pesada e/ou de cadeia leve podem ser 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade às seqüências

expostas acima. Um anticorpo tendo uma região variável de cadeia pesada e cadeia leve tendo identidade alta (isto é, 80 % ou mais) às cadeias pesadas de região variável da SEQ ID NO: 21-30 e cadeias leve de região variável da SEQ ID NO: 1-20 respectivamente, pode ser obtido através de mutagênese (por exemplo, mutagênese loco-dirigida ou mediada por PCR) das moléculas de ácido nucléico compreendendo as SEQ ID NOs: 1-30 seguido testando o anticorpo alterado codificado para função retida (isto é, as funções expostas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Em outras modalidades, as seqüências de aminoácido de cadeia leve de Ig lambda podem ser 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idênticas às seqüências expostas acima. Um anticorpo tendo uma cadeia leve de Ig lambda com identidade alta (isto é, 80 % ou mais) às cadeias leves de Ig lambda das SEQ ID NOs: 77-80 respectivamente, pode ser obtido através de mutagênese (por exemplo, mutagênese loco-dirigida ou mediada por PCR) das moléculas de ácido nucléico que codificam as SEQ ID NOs: 77-80, seguido testando o anticorpo alterado codificado para função retida (isto é, as funções expostas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Em outras modalidades, a seqüência de nucleotídeo de cadeia leve de Ig lambda pode ser 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica à seqüência exposta acima. Um anticorpo tendo uma cadeia leve de Ig lambda com identidade-alta (isto é, 80 % ou mais) à cadeia leve de Ig lambda da SEQ ID NO: 73 respectivamente, pode ser obtido através de mutagênese (por exemplo, mutagênese loco-dirigida ou mediada por PCR) das moléculas de ácido nucléico que compreendem SEQ ID NO: 73 seguido testando o anticorpo alterado codificado para função retida (isto é, as funções expostas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Em outras modalidades, as seqüências de aminoácido de cadeia leve de Ig capa podem ser 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idênticas às seqüências expostas acima. Um anticorpo tendo uma cadeia leve de Ig capa com identidade alta (isto é, 80 % ou mais) a cadeias leves de Ig capa das SEQ ID NOs: 81-84 respectivamente, pode

ser obtido através de mutagênese (por exemplo, mutagênese loco-dirigida ou mediada por PCR) das moléculas de ácido nucléico que codificam as SEQ ID NOs: 81-84, seguido por teste do anticorpo alterado codificado para função retida (isto é, as funções expostas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Em outras modalidades, a seqüência de nucleotídeo de cadeia leve de Ig capa pode ser 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica ou homóloga à seqüência exposta acima. Um anticorpo tendo uma cadeia leve de Ig capa com identidade alta (isto é, 80 % ou mais) às cadeias leves de Ig capa das SEQ ID NOs: 74-76 respectivamente, pode ser obtido através de mutagênese (por exemplo, mutagênese loco-dirigida ou mediada por PCR) das moléculas de ácido nucléico compreendendo as SEQ ID NOs: 74-76 seguido testando o anticorpo alterado codificado para função retida (isto é, as funções expostas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Em outras modalidades, o anticorpo que é uma IgG4 pode ser 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica às seqüências de aminoácido expostas acima. Uma IgG4 com identidade alta (isto é, 80 % ou mais) às composições de IgG4 das SEQ ID NOs: 89-96 respectivamente, pode ser obtida através de mutagênese (por exemplo, mutagênese loco-dirigida ou mediada por PCR) das moléculas de ácido nucléico que codificam SEQ ID NOs: 89-96, seguido por teste do anticorpo alterado codificado derivado através de mutagênese para função retida (isto é, as funções expostas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Em outras modalidades, o anticorpo é uma IgG4 que é 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica à seqüência de nucleotídeo exposta acima. Uma IgG4 com identidade alta (isto é, 80 % ou mais) à IgG4 das SEQ ID NOs: 85-88 respectivamente, pode ser obtido através de mutagênese (por exemplo, mutagênese loco-dirigida ou mediada por PCR) das moléculas de ácido nucléico compreendendo SEQ ID NOs: 85-88 seguido testando o anticorpo alterado codificado para função retida (isto é, as funções expostas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Como aqui usado, a porcentagem de identidade entre duas seqüências de aminoácido ou duas seqüências de nucleotídeo é equivalente à porcentagem de identidade entre as duas seqüências, e estes termos são usados alternadamente aqui. A porcentagem de identidade entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (isto é, % homologia = # de posições idênticas/total # de posições x 100), levando em conta o número de intervalos, e o comprimento de cada intervalo que necessita ser introduzido para alinhamento ótimo das duas seqüências. A comparação das seqüências e determinação da porcentagem de identidade entre duas seqüências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático, como descrito nos exemplos não-limitativos abaixo.

A porcentagem de identidade entre duas seqüências de aminoácido ou duas seqüências de nucleotídeo pode ser determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) em que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2,0), usando uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de intervalo de 12 e uma penalidade de intervalo de 4. Além disso, a porcentagem de identidade entre duas seqüências de aminoácido ou duas seqüências de nucleotídeo pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), usando ou uma matriz de Blossom 62 ou uma matriz de PAM250, e um peso de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

Adicionalmente ou como alternativa, as seqüências de proteína da presente invenção podem também ser usadas como uma "seqüência de consulta" para executar uma pesquisa junto às bases de dados públicas para, por exemplo, identificar as seqüências relacionadas. Tais pesquisas podem ser executadas usando o programa XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al., 1990 J. Mol. Biol. 215:403-10. As pesquisas de proteína de BLAST podem ser executadas com o programa XBLAST, contagem = 50, comprimento de palavra = 3 para obter as seqüências de aminoácido homólogas às molé-

culas de anticorpo da invenção. Para obter alinhamentos intervalados para propósitos de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizada como descrito em Altschul et al., 1997 Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Ao utilizar programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros predefinidos dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Vide <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Condições que permitirão as seqüências de nucleotídeo hibridar com as seqüências de nucleotídeo mostradas aqui, podem ser determinadas de acordo com as técnicas conhecidas. Hibridação das seqüências de nucleotídeo é realizada sob condições de severidade reduzida, severidade média ou até mesmo condições rigorosas. Condições de severidade baixa exemplares são um tampão contendo 35-40 % formamida com a solução de 5x Denhardt, 0,5 % SDS e 1xSSPE a 37° C. Condições de severidade média exemplares são um tampão contendo 40-45 % formamida com solução de 5xDenhardt, 0,5 % SDS, e 1x SSPE a 42° C. Condições de severidade alta exemplares são um tampão contendo 50 % formamida com a solução de 5x Denhardt, 0,5 % SDS e 1xSSPE a 42° C ou temperatura mais alta, dependendo da porcentagem G + C e do comprimento dos polinucleotídeos. Vide J. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.) (Cold Spring Harbor Laboratory).

Hibridação das seqüências de nucleotídeo sob qualquer uma das condições de severidade exemplares acima é executada em solução e colhida em um filtro. Alternativamente, hibridação das seqüências de nucleotídeo sob qualquer uma das condições de severidade exemplares acima é executada em géis, por exemplo Southern Blotting.

ANTICORPOS COM MODIFICAÇÕES CONSERVADORAS

Em certas modalidades, um anticorpo da invenção tem uma região de V_H incluindo seqüências selecionadas do grupo das SEQ ID NOs: 55-72 e uma região variável de cadeia leve incluindo seqüências selecionadas do grupo das SEQ ID NOs: 31-54, de modo que uma ou mais destas seqüências têm seqüências de aminoácido especificadas com base nos anticorpos descritos aqui ou modificações conservadoras dos mesmos, e os

anticorpos têm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos de anti-c-Met da invenção. Conseqüentemente, a invenção fornece um anticorpo isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, tendo uma cadeia de V_H e uma cadeia de V_L de modo que a cadeia de V_H tem seqüências de aminoácido selecionadas do grupo das SEQ ID NOs: 55-72 e modificações conservadoras das mesmas; e a cadeia de V_L tem seqüências de aminoácido selecionadas do grupo das SEQ ID NOs: 31-54 e modificações conservadoras das mesmas; o anticorpo especificamente liga a c-Met; e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo ativa induz internalização do receptor de cMet, o anticorpo inibe ligação de um fator de crescimento de proteína a c-Met, com tal inibição assim impedindo ativação do receptor, por exemplo, impedindo supra-regulação da via resultante da ativação de cMet e/ou transdução de sinal, ou o anticorpo impedindo ou melhorando a proliferação celular, sobrevivência da célula, migração, invasão ou alterações na morfologia, ou o anticorpo antagonizando a atividade de c-Met, assim impedindo ou melhorando câncer tais como crescimento de tumor e ou metástase.

Em uma modalidade alternativa, o anticorpo é agonístico e ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

Em certas modalidades, um anticorpo da invenção é uma cadeia leve de Ig lambda tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 77-80, de modo que uma ou mais destas seqüências têm seqüências de aminoácido derivadas das seqüências de aminoácido dos anticorpos descritos aqui, tendo modificações conservadoras das mesmas, de modo que os anticorpos derivados retêm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos de anti-c-Met da invenção. Conseqüentemente, a invenção fornece um anticorpo parental isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, tendo uma cadeia leve de Ig lambda de modo que a cadeia leve de Ig lambda tem seqüências de aminoácido selecionadas do grupo das SEQ ID NOs: 77-80 e modificações conservadoras das mesmas; o anticorpo especificamente liga a c-Met; e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades antagonísticas funcionais descritas aqui.

Em uma modalidade alternativa, o anticorpo é agonístico e ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

Em outras modalidades, a invenção provê um anticorpo com uma cadeia leve de Ig capa tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 81-84, de modo que um ou mais destes anticorpos têm uma seqüência de aminoácido derivada dos anticorpos descritos aqui, tendo modificações conservadoras da mesma, e em que os anticorpos demonstram as propriedades funcionais dos anticorpos de anti-c-Met de origem da invenção. Conseqüentemente, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, tendo uma cadeia leve de Ig capa de modo que a cadeia leve de Ig capa tem seqüências de aminoácido selecionadas do grupo das SEQ ID NOs: 81-84 e modificações conservadoras das mesmas; o anticorpo especificamente liga a c-Met; e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais fornecidas aqui.

Em uma modalidade alternativa, o anticorpo ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

Em outras modalidades, um anticorpo da invenção é uma IgG4 tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 89-96, em que uma ou mais destas seqüências têm uma seqüência de aminoácido derivada de uma seqüência de aminoácido parental dos anticorpos descritos aqui ou modificações conservadoras da mesma, e os anticorpos demonstram as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos de anti-c-Met da invenção. Conseqüentemente, a invenção fornece um anticorpo isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, em que o anticorpo é uma IgG4, em que: a IgG4 tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 89-96 e modificações conservadoras das mesmas; o anticorpo especificamente liga a c-Met; e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades antagonísticas funcionais descritas aqui.

Em uma modalidade alternativa, o anticorpo é agonístico e ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular.

Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir uma ou mais,

duas ou mais, ou três ou mais das propriedades funcionais antagonísticas listadas debatidas acima. Tais anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos.

Como aqui usado, o termo "modificações de sequência conservadoras" é intencionado referir-se às modificações de aminoácido que não significativamente afetam ou alteram as características de ligação do anticorpo que contém a sequência de aminoácido. Tais modificações conservadoras incluem substituições, adições e deleções de aminoácido como descritas aqui. As modificações são introduzidas em um anticorpo da invenção por técnicas padrões conhecidas na técnica, tais como mutagênese dirigida e mutagênese mediada por PCR.

Substituições de aminoácido conservadoras substituem um resíduo de aminoácido com um resíduo de aminoácido diferente que tem uma cadeia lateral química e fisicamente similar. Famílias de resíduos de aminoácido que têm cadeias laterais similares são conhecidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares descarregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não-polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Desse modo, um ou mais resíduos de aminoácido podem ser substituídos dentro das regiões de CDR de um anticorpo da invenção com outros resíduos de aminoácido da mesma família de cadeia lateral, e o anticorpo alterado pode ser testado para função retida usando os ensaios funcionais descritos aqui.

ESTRUTURAS DE ANTICORPO

Uma ampla variedade de estruturas ou andaimes de anticorpo / imunoglobulina pode ser empregada desde que o polipeptídeo resultante incluem uma ou mais região de ligação que seja específica para a proteína de cMet das seqüências exemplares aqui. Tais estruturas ou andaimes in-

cluem os 5 idiotipos principais das imunoglobulinas humanas, ou fragmentos dos mesmos (tais como aqueles revelados em outro lugar aqui), e incluem imunoglobulinas de outras espécies animais, preferivelmente tendo aspectos humanizados. Anticorpos de cadeia pesada simples tais como aqueles identificados em camelídeos são de interesse particular nesta consideração. Estruturas novas, andaimes e fragmentos continuam sendo descobertos e desenvolvidos por aqueles versados na técnica.

Alternativamente, futuras estruturas ou andaimes de não-imunoglobulina conhecidas podem ser empregadas, contanto que elas compreendam uma região de ligação específica para a proteína de c-Met. Tais compostos são conhecidos aqui como "polipeptídeos que compreendem uma região de ligação c-Met-específica". Estruturas ou andaimes de não-imunoglobulina conhecidas incluem Adnectinas (fibronectina) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurique, Suíça), anticorpos de domínio (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) e Ablynx nv (Zwijnaarde, Bélgica)), lipocalina (Anticalina) (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemanha), imuno-farmacêuticos modulares pequenos (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicorpos (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), Proteína A (Affibody AG, Suécia) e afilina (gama-cristalina ou ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemanha).

ANTICORPOS QUE LIGAM AO MESMO EPÍTOPO COMO ANTICORPO DE ANTI-c-Mets DA INVENÇÃO

Em outra modalidade, a invenção fornece anticorpos que ligam ao mesmo epítipo como os vários anticorpos de anti-c-Met da invenção fornecidos aqui o faz. Tais anticorpos adicionais podem ser identificados com base em sua habilidade para competir cruzado (por exemplo, para competitivamente inibir a ligação, em uma maneira estatisticamente significativa) com outros anticorpos da invenção em ensaios de ligação de c-Met padrões. A habilidade de um anticorpo de teste para inibir a ligação de anticorpos tendo habilidade conhecida para ligar a c-Met humano demonstra que o anticorpo de teste pode competir com aquele anticorpo. Um tal anticorpo pode, de acordo com a teoria não-limitativa, ligar o mesmo epítipo ou um relacionado

(por exemplo, um estruturalmente similar ou espacialmente próximo) em c-Met humano como o anticorpo com que compete. Tais anticorpos podem ser preparados e isolados como descritos nos Exemplos.

ANTICORPOS DE CAMELÍDEO

- 5 Proteínas de anticorpo obtidas de membros da família de camelo e dromedário (*Camelus bactrianus* e *Camelus dromaderius*) incluindo membros mundiais novos tais como espécies de lhama (*Lama paccos*, *Lama glama* e *Lamavicugna*) foram caracterizadas com respeito a tamanho, complexidade estrutural e antigenicidade em sujeitos humanos. Certos anticorpos de IgG desta família de mamíferos como se encontram na natureza carecem de cadeias leves, e desse modo têm estruturas que são distintas da estrutura quaternária de quatro cadeias típica tendo duas cadeias pesadas e duas leve, características dos anticorpos de outros animais. Vide PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 publicada em 3 de março de 1994).
- 10
- 15 Uma região do anticorpo de camelídeo que é o domínio de variável simples pequeno identificado como V_{HH} pode ser obtida através de engenharia genética para render uma proteína pequena tendo afinidade alta por um alvo, resultando em uma proteína derivada anticorpo de peso molecular baixo conhecida como um "nanocorpo de camelídeo". Vide patente U.
- 20 S. número 5.759.808 emitido em 2 de junho de 1998; vide também Stijlemans, B., et al., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M., et al., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M., et al. 2003 Bioconjugado Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V., et al. 2002 Int J Câncer 89: 456-62; e Lauwereys, M., et al. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Bibliotecas enge-
- 25 nheiradas de anticorpos de camelídeo e fragmentos de anticorpo estão comercialmente disponíveis, por exemplo, de Ablynx, Ghent, Bélgica. Como é conhecido na técnica por outros anticorpos de origem não-humana, uma sequência de aminoácido de um anticorpo de camelídeo pode ser alterada re-
- 30 combinantemente para obter uma sequência que mais estritamente se assemelha a uma sequência humana, isto é, o nanocorpo pode ser humanizado. Desse modo a antigenicidade natural baixa de anticorpos de camelídeo para humanos pode ser também reduzida.

O nanocorpo de camélídeo tem um peso molecular aproximadamente de um décimo do de uma molécula de IgG humana, e a proteína tem um diâmetro físico de apenas alguns nanômetros. Uma consequência do tamanho pequeno é a habilidade dos nanocorpos de camélídeo para ligar a sítios antigênicos que são funcionalmente invisíveis a proteínas de anticorpos maiores, isto é, nanocorpos de camélídeo são úteis como reagentes para detectar antígenos que são do contrário secretos usando técnicas imunológicas clássicas, e são também úteis como possíveis agentes terapêuticos. Por exemplo, ainda outra consequência de tamanho pequeno é que um nanocorpo de camélídeo pode inibir como resultado da ligação a um sítio específico em um sulco ou fenda estreita de uma proteína alvo, e consequentemente pode servir em uma capacidade que mais estritamente se assemelha à função de um fármaco de peso molecular baixo clássico que a de um anticorpo de peso molecular alto clássico.

O baixo peso molecular e tamanho compacto também resultam em nanocorpos de camélídeo que são extremamente termoestáveis, estáveis a pH extremo e para digestão proteolítica estável, e têm antigenicidade baixa. Outra consequência é que nanocorpos de camélídeo passam facilmente do sistema circulatório para tecidos, isto é, para extravasar, e até mesmo cruza a barreira hematoencefálica e assim pode ser engenheirado para tratar distúrbios que afetam o tecido nervoso. Nanocorpos podem também facilitar o transporte de fármaco ao longo da barreira de hematoencefálica. Vide pedido de patente U. S. 20040161738 publicada em 19 de agosto de 2004. Estas características combinadas com a antigenicidade baixo para seres humanos indicam grande potencial terapêutico. Também, estas moléculas podem ser expressas completamente em células procarióticas tais como *E. coli* são expressas como proteínas de fusão com bacteriófago, e as proteínas assim expressas são funcionais.

Conseqüentemente, uma característica da presente invenção é um anticorpo ou nanocorpo de camélídeo que tem afinidade alta por proteína de c-Met alvo. Em certas modalidades aqui, o anticorpo ou nanocorpo de camélídeo é produzido naturalmente no animal camélídeo, isto é, é produzi-

do pelo camélídeo seguindo imunização com proteína de c-Met alvo ou um fragmento de peptídeo da mesma, usando técnicas descritas aqui para outros anticorpos, ou é recombinantemente produzido em um animal camélídeo transgênico. Alternativamente, o nanocorpo de camélídeo de anti-c-Met é engenheirado, isto é, produzido pela seleção de por exemplo uma biblioteca de fago que exhibe proteínas de nanocorpo de camélídeo apropriadamente mutagenizadas usando procedimentos de *panning*, com c-Met como um alvo como descrito nos exemplos aqui. Nanocorpos engenheirados podem também ser personalizados através de engenharia genética para terem uma meia-vida em um sujeito recipiente de 45 minutos a duas semanas.

ANTICORPOS ENGENHEIRADOS E MODIFICADOS

Um anticorpo da invenção pode ser preparado usando um anticorpo tendo uma ou mais das seqüências de V_H e/ou V_L , seqüências de cadeia leve de Ig lambda, ou seqüências de cadeia leve de Ig capa mostradas aqui como material de partida, isto é, como uma seqüência parental, para criar um anticorpo modificado derivado que é um anticorpo modificado que pode ter as propriedades alteradas e melhoradas comparado ao anticorpo de partida. Um anticorpo pode ser engenheirado modificando um ou mais resíduos dentro de uma ou ambas regiões variáveis (i. e., V_H e/ou V_L) ou dentro da cadeia leve de Ig lambda apenas, ou dentro da cadeia leve de Ig capa apenas, dentro de uma ou mais regiões de CDR e/ou dentro de uma ou mais regiões da estrutura. Adicionalmente ou como alternativa, um anticorpo pode ser engenheirado modificando os resíduos dentro da(s) região(ões) constante(s), por exemplo para alterar uma função efetora do anticorpo.

Um tipo de engenharia de região variável que pode ser executada é enxerto de CDR. Anticorpos interagem predominantemente com antígenos alvos através de resíduos de aminoácido que estão localizados nas regiões de determinação de complementaridade de cadeia pesada e leve (CDRs). Por este motivo, as seqüências de aminoácido dentro das CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais que as seqüências fora das CDRs. Porque seqüências de CDR são responsáveis pela maioria das interações de anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinan-

tes que imitam as propriedades dos anticorpos de ocorrência natural específicos construindo vetores de expressão que incluem as seqüências de CDR de um anticorpo de ocorrência natural, enxertadas sobre as seqüências de estrutura de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (vide, por exemplo, Riechmann, L., et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P., et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C., et al., 1989 Proc. Natl. Acad. U.S.A 86:10029-10033; patente U. S. No. 5.225.539 para Winter e patentes U. S. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 para Queen et al.)

Tais seqüências de estrutura podem ser obtidas de bases de dados públicas de DNA ou referências publicadas que incluem seqüências de gene de anticorpo de linhagem germinal. Por exemplo, seqüências de DNA de linhagem germinal para genes humanos de região variável de cadeia pesada e leve podem ser encontradas na base de dados de seqüência de linhagem germinal humana "VBase" (disponível na Internet em www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), como também em Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U. S. Department of Health and Human Services, Publicação de NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; e Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836; os conteúdos de cada um destes são expressamente incorporados aqui por referência. Foi encontrado que sob certas circunstâncias é benéfico mutar resíduos dentro das regiões de estrutura para manter ou intensificar a habilidade de ligação de antígeno do anticorpo (vide por exemplo, Patentes U. S. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 de Queen et al).

Outro tipo de modificação da região variável é mutação dos resíduos de aminoácido dentro das regiões de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de V_H e/ou V_L para assim melhorar uma ou mais propriedades de ligação (por exemplo, afinidade) do anticorpo de interesse, conhecida como "maturação de afinidade". Mutagênese loco-dirigida ou mutagênese mediada por PCR podem ser executadas para introduzir a(s) mutação(ões), e o efeito consequente na ligação do anticorpo ou em outra propriedade funcional de interesse é avaliado por ensaios *in vitro* ou *in vivo* como descritos aqui e fornecidos nos

Exemplos. Modificações conservadoras (como debatidas acima) podem ser introduzidas. As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácido. Tipicamente, não mais que um, dois, três, quatro ou cinco resíduos são alterados dentro de uma região de CDR, embora alterações adicionais sejam também intencionadas.

Anticorpos engenheirados da invenção incluem aqueles em que modificações foram feitas nos resíduos da estrutura dentro das cadeias V_H e/ou V_L , e/ou leve de Ig lambda, e/ou cadeias leves de Ig capa, por exemplo para melhorar as propriedades do anticorpo. Tipicamente, tais modificações de estrutura são feitas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, um método é para "re-mutar" um ou mais resíduos da estrutura para aquele da seqüência de linhagem germinal correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que sofreu mutação somática pode conter resíduos de estrutura que diferem da seqüência de linhagem germinal da qual o anticorpo é derivado. Tais resíduos podem ser identificados comparando as seqüências de estrutura de anticorpo às seqüências de linhagem germinal das quais o anticorpo é derivado. Para retornar as seqüências da região de estrutura para sua configuração de linhagem germinal, as mutações somáticas são re-mutadas para os resíduos de linhagem germinal, por exemplo, por mutagênese dirigida ou mutagênese mediada por PCR. Tais anticorpos re-mutados são também abrangidos dentro da invenção.

Outro tipo de modificação da estrutura envolve mutar um ou mais resíduos dentro da região de estrutura, ou até mesmo dentro de uma ou mais regiões de CDR, para remover os epítomos de célula T para assim reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Este método é também referido como "desimunização" e é descrito em mais detalhe na Publicação de patente U. S. No. 20030153043 por Carr et al.

Além disso ou alternativamente às modificações feitas dentro das regiões de estrutura ou de CDR, anticorpos da invenção podem ser engenheirados para incluir modificações dentro da região de F_c , tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tais como meia-vida de soro, fixação de complemento, ligação de receptor de F_c , e/ou

citotoxicidade celular antígeno-dependente. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser modificado quimicamente (por exemplo, uma ou mais metades químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou ser modificado para alterar sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma destas modalidades é descrita em mais detalhe abaixo. A numeração dos resíduos na região de Fc é a do índice EU de Kabat.

Em uma modalidade, a região de dobradiça de CH1 é modificada de modo que o número de resíduos de cisteína na região de dobradiça é alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Este método é descrito também na patente U. S. No. 5.677.425 por Bodmer et al. O número de resíduos de cisteína na região de dobradiça de CH1 é alterado, por exemplo, para facilitar a montagem das cadeias leves e pesadas ou aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

Em outra modalidade, a região de dobradiça de Fc de um anticorpo é mutada para diminuir a meia-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácido são introduzidas na região de interface do domínio de CH2-CH3 do fragmento de dobradiça de Fc de modo que o anticorpo tem ligação prejudicada da proteína de Staphylococcal A (SpA) com relação à ligação de SPA do domínio de dobradiça de Fc nativo. Este método é descrito em mais detalhe na patente U. S. No. 6.165.745 por Ward et al.

Em outra modalidade, o anticorpo é modificado para aumentar sua meia-vida biológica. Vários métodos são possíveis. Por exemplo, uma ou mais das mutações a seguir podem ser introduzidas: T252L, T254S, T256F, como descritas na patente U. S. No. 6.277.375 para Ward. Alternativamente, para aumentar a meia-vida biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região de CH1 ou CL para conter um receptor de aproveitamento que liga o epítopo tirado das duas alças de um domínio de CH2 de uma região de Fc de uma IgG, como descrito nas patentes U. S. Nos. 5.869.046 e 6.121.022 por Presta et al.

Em ainda outras modalidades, a região de Fc é alterada substi-

tuindo pelo menos um resíduo de aminoácido com um resíduo de aminoácido diferente para alterar as funções efetoras do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente de modo que o anticorpo tenha uma afinidade alterada por um ligante efetor mas retenha a habilidade de ligação de antígeno do anticorpo de origem. O ligante efetor ao qual afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um receptor de Fc ou o componente de C1 de complemento. Este método é descrito em mais detalhe nas patentes U. S. Nos. 5.624.821 e 5.648.260, ambos por Winter et al.

10 Em outra modalidade, um ou mais aminoácidos selecionados dos resíduos de aminoácido podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente de modo que o anticorpo tem ligação alterada de C1q e/ou citotoxicidade dependente de complemento reduzida ou abolida (CDC). Este método é descrito em mais detalhe nas patentes U. S. Nos. 6.194.551
15 por Idusogie et al.

 Em outra modalidade, um ou mais resíduos de aminoácido são alterados assim para alterar a habilidade do anticorpo para fixar o complemento. Este método é descrito também na Publicação de PCT WO 94/29351 por Bodmer et al.

20 Em ainda outra modalidade, a região de Fc é modificada para aumentar a habilidade do anticorpo para mediar citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou aumentar a afinidade do anticorpo por um receptor de Fcγ modificando um ou mais aminoácidos. Este método é descrito também na Publicação de PCT WO 00/42072 por Presta. Além disso, os sítios de ligação em IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII e FcRn
25 foram mapeados e variantes com ligação melhorada foram descritas (vide Shields, R. L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Anticorpos que têm tais regiões de Fc modificadas estão dentro do escopo das composições aqui.

30 Em ainda outra modalidade, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, um anticorpo aglicosilado pode ser feito (isto é, o anticorpo carece de glicosilação). Glicosilação pode ser alterada, por exem-

plo, para aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno de c-Met alvo. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, alterando um ou mais sítios de glicosilação dentro da sequência do anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácido podem ser feitas que resulta em eliminação de um ou mais sítios de glicosilação de estrutura de região variável para assim eliminar a glicosilação naquele sítio. Tal aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo por antígeno. Um tal método é descrito em mais detalhe nas patentes U. S. Nos. 5.714.350 e 6.350.861 por Co et al.

10 Adicionalmente ou como alternativa, um anticorpo pode ser feito tendo um tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipofucosilado tendo quantidades reduzidas de resíduos de fucosila ou um anticorpo tendo estruturas de GlcNac de bifurcação aumentadas. Tais padrões de glicosilação alterados foram demonstrados aumentar a atividade de ADCC dos anticorpos. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, expressando o anticorpo em uma célula hospedeira com maquinaria enzimática de glicosilação alterada. Células com maquinaria de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiras em que para expressar anticorpos recombinantes da invenção para

20 assim produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, EP 1.176.195 por Hang et al. descreve uma linhagem celular com um gene de FUT8 funcionalmente rompido que codifica uma fucosil transferase de modo que os anticorpos expressos em um tal linhagem celular exibem hipofucosilação. Publicação de PCT WO 03/035835 por Presta descreve uma linhagem celular de CHO variante, células Lec13, com habilidade reduzida para ligar fucose a carboidratos ligados a Asn(297), também resultando em hipofucosilação dos anticorpos expressos naquela célula hospedeira (vide também Shields, R. L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Publicação de PCT WO 99/54342 por Umana et al. descreve linhagens celulares engenheiradas para expressar glicosil transferases de modificação da glicoproteína (por exemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII)) de modo que os anticorpos expressos nas linhagens celulares engenheirada

25

30

exibem estruturas de GlcNac de bifurcação aumentadas que resultam na atividade de ADCC aumentada dos anticorpos (vide também Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

Outra modificação dos anticorpos aqui que é contemplada pela invenção é pegilação. Um anticorpo pode ser pegilado para, por exemplo, aumentar a meia-vida biológica (por exemplo, soro) do anticorpo. Para pegilar um anticorpo, o anticorpo, ou fragmento do mesmo, é tipicamente reagido com polietileno glicol (PEG), tal como um éster reativo ou derivado de aldeído de PEG, sob condições em que um ou mais grupos de PEG se tornam covalentemente ligados ao anticorpo ou fragmento de anticorpo. A pegilação pode ser realizada por uma reação de acilação ou por uma reação de alquilação com uma molécula de PEG reativo (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Como aqui usado, o termo "polietileno glicol" é intencionaldo que abranger quaisquer das formas de PEG que foram usadas para derivatizar outras proteínas, tais como mono (C1-C10) alcóxi- ou arilóxi-polietileno glicol ou polietileno glicol-maleimida. Em certas modalidades, o anticorpo a ser pegilado é um anticorpo aglicosilado. Métodos para pegilar proteínas são conhecidos na técnica e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção. Vide por exemplo, EP 0 154 316 por Nishimura et al. e EP 0 401 384 por Ishikawa et al.

MÉTODOS DE CRIAR ANTICORPOS

Como debatido acima, os anticorpos de anti-c-Met tendo seqüências de cadeia V_H , V_L , leve de Ig lambda ou cadeia leve de Ig capa mostradas aqui podem ser usados para criar anticorpos de anti-c-Met adicionais modificando os resíduos nas cadeias V_H e/ou, V_L , e/ou leve de Ig lambda e/ou seqüências de cadeia leve de Ig capa, ou modificando a(s) região(ões) constante(s) ligada(s) a estas. Desse modo, em outro aspecto da invenção, as características estruturais de um anticorpo de anti-c-Met da invenção são usadas para criar anticorpos de anti-c-Met estruturalmente relacionados re- tendo pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos antagonísticos ou agonísticos parentais da invenção, tais como ligação a c-Met humano e também inibindo uma ou mais propriedades funcionais de c-Met (por exem-

plo, induzindo internalização, impedindo ativação, por exemplo, uma supra-regulação resultando da transdução de sinal, impedindo ou melhorando a sobrevivência da proliferação, migração, invasão celulares ou alterações em morfologia ou o anticorpo inibe ligação de receptor de c-Met impedindo ou
5 melhorando câncer tal como crescimento de tumor e ou metástase) ou no caso agonístico, ativando fosforilação de c-Met e estimulando uma resposta celular, como também outras propriedades funcionais fornecidas aqui.

Por exemplo, uma ou mais regiões de CDR dos anticorpos da presente invenção, ou mutações dos mesmos, podem ser combinadas re-
10 combinantemente com as regiões de estrutura conhecidas e/ou outras CDRs para criar anticorpos de anti-c-Met, recombinantemente engenheirados, adicionais da invenção, como debatidos acima. Outros tipos de modificações incluem aquelas descritas na seção anterior. O material de partida para o método de engenharia é uma ou mais das seqüências de V_H e/ou V_L forneci-
15 das aqui, ou uma ou mais regiões de CDR das mesmas a serem usadas como uma seqüência parental. Para criar o anticorpo engenheirado, não é necessário de fato preparar (isto é, expressar como uma proteína) um anti-corpo tendo uma ou mais das seqüências de V_H e/ou V_L fornecidas aqui, ou uma ou mais regiões de CDR das mesmas. De preferência, a informação
20 contida na(s) seqüência(s) de nucleotídeo ou aminoácido é usada como o material de partida para técnicas mutacionais conhecidas na técnica para criar uma(s) seqüência(s) de "segunda geração" derivada(s) da(s) seqüência(s) original(is) e depois a(s) seqüência(s) de "segunda geração" de nucleotídeo é/são preparada(s) e expressa(s) como uma proteína.

25 Conseqüentemente, em certas modalidades, a invenção fornece um método para preparar um anticorpo de anti-c-Met tendo como material de partida parental uma seqüência de anticorpo de V_H tendo uma seqüência selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 55-72 e uma seqüência de anticorpo de V_L tendo uma seqüência selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 31-54.
30 O método envolve alterar pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da seqüência parental de anticorpo de V_H e/ou V_L para criar pelo menos uma seqüência de anticorpo alterada; e expressar a seqüência de anticorpo alte-

rada como uma proteína.

Em outras modalidades, a invenção fornece um método para preparar um anticorpo de anti-c-Met que compreende: uma seqüência de anticorpo de cadeia leve de Ig lambda tendo uma seqüência selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 77-80, e alterar pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da seqüência de anticorpo de cadeia leve de Ig lambda para criar pelo menos uma seqüência de anticorpo alterada; e expressar a seqüência de anticorpo alterada como uma proteína.

Em modalidades relacionadas, a invenção fornece um método para preparar um anticorpo de anti-c-Met que compreende: uma seqüência de anticorpo de cadeia leve de Ig capa tendo uma seqüência selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 81-84; alterar pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da seqüência de anticorpo de cadeia leve de Ig capa para criar pelo menos uma seqüência de anticorpo alterada; e expressar a seqüência de anticorpo alterada como uma proteína.

O anticorpo alterado pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três ou mais das propriedades funcionais debatidas aqui.

As propriedades funcionais dos anticorpos alterados podem ser avaliadas usando ensaios padrões disponíveis na técnica e/ou descritos aqui, tais como aqueles expostos nos Exemplos (por exemplo, ELISAs).

Em certas modalidades dos métodos de criar anticorpos da invenção, mutações podem ser fortuita ou seletivamente introduzidas ao longo de toda ou parte de uma seqüência de codificação de anticorpo de anti-c-Met e os anticorpos de anti-c-Met modificados resultantes podem ser expressos e triados para atividade de ligação e/ou outras propriedades funcionais como descritas aqui. Métodos mutacionais foram descritos na técnica. Por exemplo, Publicação de PCT WO 02/092780 por Short descreve métodos para criar e triar mutações de anticorpo usando mutagênese de saturação, montagem de ligação sintética, ou uma combinação destes. Alternativamente, Publicação de PCT WO 03/074679 por Lazar et al. descreve métodos de usar métodos de triagem computacional para otimizar as propriedades físico-químicas dos anticorpos.

ANTICORPOS DA INVENÇÃO

As seqüências de nucleotídeo e polipeptídeo são fornecidas dos anticorpos da invenção abaixo. As seqüências de aminoácido e de nucleotídeo dos anticorpos parentais, ou primeira triagem, são fornecidas na Tabela A e Tabela C, respeitosamente. As seqüências de aminoácido e nucleotídeo dos anticorpos de afinidade melhorada quando comparados aos anticorpos parentais são fornecidas na Tabela B e Tabela D, respeitosamente.

TABELA A: SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDO DE REGIÕES VARIÁVEIS DE CADEIA PESADA E LEVE DE ANTICORPOS PARENTAIS DE Fab DE AN-

10 TI-cMet

04536 VH:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD
PGFFYYTPSDLWGQGGLTVTVSS

04536 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADS
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQAYDSSMLRVFGGG
TKLTVLGQ

04687 VH:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARVYQ
DVWGQGGLTVTVSS

04687 VL:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFLGWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYNHPHTF
GQGTKVEIKRT

04541 VH:

QVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISSSSYYWNWIRQAPGKGLEWI
 GEIYFGWTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCARGYE
 FHGYTTFDYWGGGTLTVSS

04541 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSYVYVYQQKPGQAPVLVIYDDN
 DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDFPSIVFGGGTK
 LTVLGQ

04537 VH:

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMG
 FIFPDTSYTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVKLI
 TDYWGGGTLTVSS

04537 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRSYFVSWYQQKPGQAPVLVIYDDD
 DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCASWDTLSDVEVFGG
 GTKLTVLGQ

04690 VH:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGRGLEWL
 GRIYYRSKWVNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
 QGAVYPGPYGFVDVWGQGTTLTVSS

04690 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDKLGSYFVYVYQQKPGQAPVLVIYDDD
 NRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSFSGISNFYVFGGGT
 KLTVLGQ

04682 VH:

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYGIAWVRQMPGKGLEWMGI
 IYPSDSYTNYSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARMSY
 DYQHQAPSMDSWGQGTTLTVSS

04682 VL:

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVIWYQQLPGTAPKLLIYDD
 TNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCSTYDNYQAGWVFG
 GGTKLTVLGQ

TABELA B: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDO DE REGIÕES VARIÁVEIS DE CADEIA PESADA E LEVE DE ANTICORPOS DE FAB DE ANTI-cMet MELHORADOS NA AFINIDADE

05078 VH:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIIDPWNGQTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARD
PGFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS

05078 VL = 04536 VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADS
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQAYDSSMLRVFGGG
TKLTVLGQ

05079 VH:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQGLEWM
GVDPWNGITNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARD
PGFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS

05079 VL = 04536 VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADS
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQAYDSSMLRVFGGG
TKLTVLGQ

05087 VH = 04536 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARD
PGFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS

05087 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADS
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANYHDSWVFGG
GTKLTVLGQ

05088 VH = 04536 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD
PGFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS

05088 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADS
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYASDYTSWVFGG
GTKLTVLGQ

05091 VH = 04536 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD
PGFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS

05091 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADS
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYAHYHDIWVFGG
GTKLTVLGQ

05092 VH = 04536 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD
PGFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS

05092 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADS
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQAHDSLVSFVGGGT
KLTVLGQ

05081 VH:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIDPIMGTEYAQKFQGRVTITADESTAYMELSSLRSEDVAVYYCARVYQ
DVWGQGTLVTVSS

05081 VL = 04687 VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFLGWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYNHPHTF
GQGTKVEIKRT

05082 VH:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
EIDPVIGETDYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARVYQ
DVWGQGGLVTVSS

05082 VL = 04687 VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFLGWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYNHPHTF
GQGTKVEIKRT

05097 VH = 04687 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARVYQ
DVWGQGGLVTVSS

05097 VL:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFLGWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYAFGWTF
GQGTKVEIKRT

05098 VH = 04687 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARVYQ
DVWGQGGLVTVSS

05098 VL:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFLGWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQYSDEPWTF
GQGTKVEIKRT

05100 VH = 04687 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARVYQ
DVWGQGGLVTVSS

05100 VL:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFLGWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYAYEPNTF
GQGTKVEIKRT

05101 VH = 04687 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMG
GIDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVYQ
DVWGQGGLVTVSS

05101 VL:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFLGWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQYAFSPWTF
GQGTKVEIKRT

05093 VH = 04541 VH

QVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISSSSYWNWIRQAPGKGLEWI
GEIYFGWTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCARGYE
FHGYTTFDYWGQGGLVTVSS

05093 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSYVYVYQQKPGQAPVLVIYDDN
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDSYIFVFGGGTK
LTVLGQ

05094 VH = 04541 VH

QVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISSSSYWNWIRQAPGKGLEWI
GEIYFGWTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCARGYE
FHGYTTFDYWGQGGLVTVSS

05094 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSYVYVYQQKPGQAPVLVIYDDN
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSTYDAFTFVFGGGTK
LTVLGQ

05095 VH = 04541 VH

QVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISSSSYWNWIRQAPGKGLEWI
GEIYFGWTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCARGYE
FHGYTTFDYWGQGGLVTVSS

05095 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSYVYVYQQKPGQAPVLVIYDDN
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDKYVFVFGGGTK
LTVLGQ

05102 VH = 04537 VH

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMG
FIFPDTSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVKLI
TDYWGQGTLTVSS

05102 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRSYFVSWYQQKPGQAPVLVIYDDD
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCASWDPPSAFEVFGG
GTKLTVLGQ

05105 VH = 04537 VH

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMG
FIFPDTSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVKLI
TDYWGQGTLTVSS

05105 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRSYFVSWYQQKPGQAPVLVIYDDD
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCASWDNDHFEVFGGG
TKLTVLGQ

05106 VH = 04690 VH

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGRGLEWL
GRIYYRSKWVNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
QGAVYPGPYGFVDWGQGTLTVSS

05106 VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDKLGSYFVYWYQQKPGQAPVLVIYDDD
NRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCGSWAYLGDVFGGGT
KLTVLGQ

05174 VH = 05078 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYIMNWVRQAPGQGLEWM
GIIDPWNGQTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD
PGFFYYTPSDLWGQGTLTVSS

05174 VL = 05087 VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADS
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANYHDSWVFGG
GTKLTVLGQ

05184 VH = 05078 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIIDPWNGQTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD
PGFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS

05184 VL = 05091 VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQQKPGQAPVLVIYADS
DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYAHYHDIWVFGG
GTKLTVLGQ

05185 VH = 05081 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIDPIMGTEYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVYQ
DVWGQGTLVTVSS

05185 VL = 05100 VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFLGWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYAYEPNTF
GQGTKVEIKRT

05186 VH = 05081 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG
GIDPIMGTEYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVYQ
DVWGQGTLVTVSS

05186 VL = 05101 VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFLGWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQYAFSPWTF
GQGTKVEIKRT

TABELA C: SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDO DE REGIÕES VARIÁVEIS DE
CADEIA PESADA E LEVE DE ANTICORPOS PARENTAIS DE Fab DE AN-
TI-cMet

04536 VH:

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGC
GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTGGTTAT
TATATGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATG
GGCATTATCAATCCGTGGACTGGCAATACGAATTACGCGCAGAAGTTTC
AGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACCGCGTATA
TGAACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCG
CGCGTGATCCTGGTTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGCCAA
GGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA

04536 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAATAAGTATGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGC
TGATTCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGGCTTATGATTCTTCTATGCTTCGTGTGT
TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

04687 VH:

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGC
AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTTCTTCTTATG
CTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCGGTATCGATCCGTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGG
GCCGGGTGACCATACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGG
AACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGTTTATCAGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT
CA

04687 VL:

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGGCGGTGAGCCTGGG
CGAACGTGCGACCATTAAGTGCAGAAGCAGCCAGTCTATTCTTTATGGT
ATTAACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAGCCGC
CGAAACTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGGGGTCCCGGA
TCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTTCG
TCCCTGCAAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATTATA
ATCATCCTCATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTAC
G

04541 VH:

CAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAA
ACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTTTCCGGAGGTAGCATTTCTTCTTCTT
CTTATTATTGGAATTGGATTCGCCAGGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTG
GATTGGCGAGATCTATTTTGGCTGGACCTATTATAATCCGAGCCTGAAA
GGCCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGA
AACTGAGCAGCGTGACGGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGGTTATGAGTTTCATGGTTATACTACTTTTGATTATTGGGGCCAAGGC
ACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

04541 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATATTGGTTCTTATTATGTTTA
TTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGAT
GATAATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACA
GCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGAC
GAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGATTTTCCTTCTATTGTGTTTGG
CGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

04537 VH:

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAA
AGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGATATTCCTTTTCTAATTATTG
GATTGGTTGGGTGCGCCAGATGCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCTTTATCTTTCCGGATACTAGCTATAACCGTTATTCTCCGAGCTTTCAG
GGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGCATTAGCACCGCGTATCTT
CAATGGAGCAGCCTGAAAGCGAGCGATACGGCCATGTATTATTGCGCG
CGTGTTAAGCTTATTACTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGG
TTAGCTCA

04537 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTCTTCGTTCTTATTTGTTTC
TTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGAT
GATGATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCGCTTCTTGGGATACTCTTTCTGATGTTGAG
GTGTTTGGCGGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

04690 VH:

CAGGTGCAATTGCAACAGTCTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGAGCCAA
ACCCTGAGCCTGACCTGTGCGATTTCCGGAGATAGCGTGAGCTCTAATT
CTGCTGCTTGGGGTTGGATTGCGCCAGTCTCCTGGGCGTGGCCTCGAGT
GGCTGGGCCGTATCTATTATCGTAGCAAGTGGGTAAACGATTATGCGGT
GAGCGTGAAAAGCCGGATTACCATCAACCCGGATACTTCGAAAAACAG
TTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGATACGGCCGTGTATT
ATTGCGCGCGTCAGGGTGCTGTTTATCCTGGTCCTTATGGTTTTGATGT
TTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

04690 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAAGCTTGGTTCTTATTTTGT
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCGAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGA
TGATGATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTTTGGTATTTCTAATTTTTATGTGT
TGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

04682 VH:

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAG
CGTGTGACCATCTCGTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTTCTAATT
ATGTGATTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAACTTCTGA
TTTATGATGATACTAATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGG
ATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAG
CGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTACTTATGATAATTATCAGGCTG
GTTGGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

04682 VL:

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAA
AGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGATATTCCTTTACTAATTATGG
TATTGCTTGGGTGCGCCAGATGCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATGGG
CATTATCTATCCGTCTGATAGCTATAACCAATTATTCTCCGAGCTTTCAGG
GCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGCATTAGCACCGCGTATCTTCA
ATGGAGCAGCCTGAAAGCGAGCGATACGGCCATGTATTATTGCGCGCG
TATGTCTTATGATTATCAGCATCAGGCTCCTTCTATGGATTCTTGGGGCC
AAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

TABELA D: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDO DE REGIÕES VARIÁVEIS DE CADEIA PESADA E LEVE DE ANTICORPOS DE FAB DE ANTI-cMet MELHORADOS NA AFINIDADE

05078 VH:

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGC
GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTGGTTAT
TATATGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATG
GGCATTATTGATCCTTGGAATGGTCAGACTAATTATGCTCAGAAGTTTCA
GGGTCGGGTCACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACCGCGTATAT
GGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGC
GCGTGATCCTGGTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05078 VL = 04536 VL

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAATAAGTATGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGC
TGATTCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGGCTTATGATTCTTCTATGCTTCGTGTGT
TTGGCGGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG

05079 VH:

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGC
GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTGGTTAT
TATATGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATG
GGCGTTATTGATCCTTGGAATGGTATTACTAATTATGCTCAGAAGTTTCA
GGGTCGGGTCACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACCGCGTATAT
GGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGC
GCGTGATCCTGGTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05079 VL = 04536 VL

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAATAAGTATGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGC
TGATTCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGGCTTATGATTCTTCTATGCTTCGTGTGT
TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05087 VH = 04536 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGC
GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTGGTTAT
TATATGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATG
GGCATTATCAATCCGTGGACTGGCAATACGAATTACGCGCAGAAGTTTC
AGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACCGCGTATA
TGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCG
CGCGTGATCCTGGTTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGCCAA
GGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05087 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAATAAGTATGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGC
TGATTCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGCTAATTATCATGATTCTTGGG
TGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05088 VH = 04536 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGC
GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTGGTTAT
TATATGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATG
GGCATTATCAATCCGTGGACTGGCAATACGAATTACGCGCAGAAGTTTC
AGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACCGCGTATA
TGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCG
CGCGTGATCCTGGTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGCCAA
GGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05088 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAATAAGTATGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGC
TGATTCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGCTTCTGATTATACTTCTTGGG
TGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05091 VH = 04536 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGC
GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTGGTTAT
TATATGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATG
GGCATTATCAATCCGTGGACTGGCAATACGAATTACGCGCAGAAGTTTC
AGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACCGCGTATA
TGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCG
CGCGTGATCCTGGTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGCCAA
GGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05091 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAATAAGTATGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGC
TGATTCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGCTCATTATCATGATATTTGGG
TGTTTGGCGGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05092 VH = 04536 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGC
GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTGGTTAT
TATATGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATG
GGCATTATCAATCCGTGGACTGGCAATACGAATTACGCGCAGAAGTTTC
AGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACCGCGTATA
TGAACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCG
CGCGTGATCCTGGTTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGCCAA
GGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05092 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAATAAGTATGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGC
TGATTCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGGCTCATGATTCTCTTTATTCTCGTGTGT
TTGGCGGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05081 VH:

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGC
AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTTCTTCTTATG
CTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCGGTATTGATCCTATTATGGGTACTGAGTATGCTCAGAAGTTTCAGGG
TCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCCAGCACCGCGTATATGGA
ACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCG
TGTTTATCAGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05081 VL = 04687 VL

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGGCGGTGAGCCTGGG
CGAACGTGCGACCATTAAGTGCAGAAGCAGCCAGTCTATTCTTTATGGT
ATTAACAATAATTTTCTGGGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAGCCGC
CGAACTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGGGGTCCCGGA
TCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTTCG
TCCCTGCAAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATTATA
ATCATCCTCATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTAC
G

05082 VH:

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGC
AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTTCTTCTTATG
CTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCGAGATTGATCCTGTTATTGGTGAGACTGATTATGCTCAGAAGTTTCA
GGGTCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCCAGCACCGCGTATAT
GGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGC
GCGTGTTTATCAGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAG
CTCA

05082 VL = 04687 VL

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGGCGGTGAGCCTGGG
CGAACGTGCGACCATTAAGTGCAGAAGCAGCCAGTCTATTCTTTATGGT
ATTAACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAGCCGC
CGAAACTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGGGGTCCCGGA
TCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTTCG
TCCCTGCAAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATTATA
ATCATCCTCATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTAC
G

05097 VH = 04687 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGC
AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTTCTTCTTATG
CTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCGGTATCGATCCGTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGG
GCCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCCAGCACCGCGTATATGG
AACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGTTTATCAGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT
CA

05097 VL:

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGGCGGTGAGCCTGGG
CGAACGTGCGACCATTAAGTGCAGAAGCAGCCAGTCTATTCTTTATGGT
ATTAACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAGCCGC
CGAAACTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGGGGTCCCGGA
TCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTTCG
TCCCTGCAAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGCTT
TTGGTTGGACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG

05098 VH = 04687 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGC
AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTTCTTCTTATG
CTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCGGTATCGATCCGTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGG
GCCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGG
AACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGTTTATCAGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT
CA

05098 VL:

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGGCGGTGAGCCTGGG
CGAACGTGCGACCATTAAGTGCAGAAGCAGCCAGTCTATTCTTTATGGT
ATTAACAATAATTTTCTGGGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAGCCGC
CGAAACTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGGGGTCCCGGA
TCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTTG
TCCCTGCAAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCTTCAGTATTCTG
ATGAGCCTTGGACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTAC
G

05100 VH = 04687 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGC
AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTTCTTCTTATG
CTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCGGTATCGATCCGTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGG
GCCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGG
AACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGTTTATCAGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT
CA

05100 VL:

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGGCGGTGAGCCTGGG
CGAACGTGCGACCATTAAGTGCAGAAGCAGCCAGTCTATTCTTTATGGT
ATTAACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAGCCGC
CGAAACTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGGGGTCCCGGA
TCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTTCG
TCCCTGCAAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGCTT
ATGAGCCTAATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTAC
G

05101 VH = 04687 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGC
AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTTCTTCTTATG
CTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCGGTATCGATCCGTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGG
GCCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCAGCGTATATGG
AACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGTTTATCAGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCT
CA

05101 VL:

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGGCGGTGAGCCTGGG
CGAACGTGCGACCATTAAGTGCAGAAGCAGCCAGTCTATTCTTTATGGT
ATTAACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAGCCGC
CGAAACTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGGGGTCCCGGA
TCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTTCG
TCCCTGCAAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCTTCAGTATGCTT
TTTCTCCTTGGACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTAC
G

05093 VH = 04541 VH

CAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAA
ACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTTTCCGGAGGTAGCATTTCTTCTTCTT
CTTATTATTGGAATTGGATTCGCCAGGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTG
GATTGGCGAGATCTATTTTGGCTGGACCTATTATAATCCGAGCCTGAAA
GGCCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAAGTTTAGCCTGA
AACTGAGCAGCGTGACGGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGGTTATGAGTTTCATGGTTATACTACTTTTGATTATTGGGGCCAAGGC
ACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05093 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATATTGGTTCTTATTATGTTTA
TTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGAT
GATAATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACA
GCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGAC
GAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGATTCTTATATTTTTGTGTTTGGC
GGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05094 VH = 04541 VH

CAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAA
ACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTTTCCGGAGGTAGCATTTCTTCTTCTT
CTTATTATTGGAATTGGATTCGCCAGGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTG
GATTGGCGAGATCTATTTTGGCTGGACCTATTATAATCCGAGCCTGAAA
GGCCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAAGTTTAGCCTGA
AACTGAGCAGCGTGACGGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGGTTATGAGTTTCATGGTTATACTACTTTTGATTATTGGGGCCAAGGC
ACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05094 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATATTGGTTCTTATTATGTTTA
TTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGAT
GATAATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACA
GCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGAC
GAAGCGGATTATTATTGCTCTACTTATGATGCTTTTACTTTTGTGTTTGG
CGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05095 VH = 04541 VH

CAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAA
ACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTTTCCGGAGGTAGCATTTCTTCTTCTT
CTTATTATTGGAATTGGATTGCGCCAGGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTG
GATTGGCGAGATCTATTTTGGCTGGACCTATTATAATCCGAGCCTGAAA
GGCCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGA
AACTGAGCAGCGTGACGGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC
GTGGTTATGAGTTTCATGGTTATACTACTTTTGATTATTGGGGCCAAGGC
ACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05095 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATATTGGTTCTTATTATGTTTA
TTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGAT
GATAATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACA
GCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGAC
GAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGATAAGTATGTTTTTGTGTTTGG
CGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05102 VH = 04537 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAA
AGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGATATTCCTTTTCTAATTATTG
GATTGGTTGGGTGCGCCAGATGCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCTTTATCTTTCCGGATACTAGCTATAACCGTTATTCTCCGAGCTTTCAG
GGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGCATTAGCACCGCGTATCTT
CAATGGAGCAGCCTGAAAGCGAGCGATACGGCCATGTATTATTGCGCG
CGTGTTAAGCTTATTACTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGG
TTAGCTCA

05102 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTCTTCGTTCTTATTTGTTTC
TTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGAT
GATGATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCGCTTCTTGGGATCCTCCTTCTGCTTTTGAG
GTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05105 VH = 04537 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGAA
AGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGATATTCCTTTTCTAATTATTG
GATTGGTTGGGTGCGCCAGATGCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCTTTATCTTTCCGGATACTAGCTATAACCGTTATTCTCCGAGCTTTCAG
GGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGCATTAGCACCGCGTATCTT
CAATGGAGCAGCCTGAAAGCGAGCGATACGGCCATGTATTATTGCGCG
CGTGTTAAGCTTATTACTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGG
TTAGCTCA

05105 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTCTTCGTTCTTATTTTGTTC
TTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGAT
GATGATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCGCTTCTTGGGATAATGATCATTTTGAGGTGT
TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05106 VH = 04690 VH

CAGGTGCAATTGCAACAGTCTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGAGCCAA
ACCCTGAGCCTGACCTGTGCGATTTCCGGAGATAGCGTGAGCTCTAATT
CTGCTGCTTGGGGTTGGATTGCGCAGTCTCCTGGGCGTGGCCTCGAGT
GGCTGGGCCGTATCTATTATCGTAGCAAGTGGGTAAACGATTATGCGGT
GAGCGTGAAAAGCCGGATTACCATCAACCCGGATACTTCGAAAAACCAG
TTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGATACGGCCGTGTATT
ATTGCGCGCGTCAGGGTGCTGTTTATCCTGGTCCTTATGGTTTTGATGT
TTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05106 VL:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAAGCTTGGTTCTTATTTTGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGA
TGATGATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCGGTTCTTGGGCTTATCTTGGTGATGTGTTT
GGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05174 VH = 05078 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGC
GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTGGTTAT
TATATGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATG
GGCATTATTGATCCTTGGAATGGTCAGACTAATTATGCTCAGAAGTTTCA
GGGTCGGGTCACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACCGCGTATAT
GGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGC
GCGTGATCCTGGTTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05174 VL = 05087 VL

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAATAAGTATGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGC
TGATTCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGCTAATTATCATGATTCTTGGG
TGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05184 VH = 05078 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGC
GAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCTTTACTGGTTAT
TATATGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATG
GGCATTATTGATCCTTGGAATGGTCAGACTAATTATGCTCAGAAGTTTCA
GGGTCGGGTCACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACCGCGTATAT
GGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGC
GCGTGATCCTGGTTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGCCAAG
GCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05184 VL = 05091 VL

GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAG
ACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTAATAAGTATGTTC
ATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGC
TGATTCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAAC
AGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGA
CGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGCTCATTATCATGATATTTGGG
TGTTTGGCGGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG

05185 VH = 05081 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGC
AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTTCTTCTTATG
CTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCGGTATTGATCCTATTATGGGTACTGAGTATGCTCAGAAGTTTCAGGG
TCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACC GCGTATATGGA
ACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCG
TGTTTATCAGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05185 VL = 05100 VL

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGGCGGTGAGCCTGGG
CGAACGTGCGACCATTA ACTGCAGAAGCAGCCAGTCTATTCTTTATGGT
ATTAACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAGCCGC
CGAAACTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGGGGTCCCGGA
TCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTTCG
TCCCTGCAAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGCTT
ATGAGCCTAATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTAC
G

05186 VH = 05081 VH

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGC
AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTTCTTCTTATG
CTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGG
GCGGTATTGATCCTATTATGGGTACTGAGTATGCTCAGAAGTTTCAGGG
TCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACC GCGTATATGGA
ACTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCG
TGTTTATCAGGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05186 VL = 05101 VL

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGGCGGTGAGCCTGGG
CGAACGTGCGACCATTAAGTGCAGAAGCAGCCAGTCTATTCTTTATGGT
ATTAACAATAATTTTCTGGGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAGCCGC
CGAAACTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGGGGTCCCGGA
TCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTTG
TCCCTGCAAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCTTCAGTATGCTT
TTTCTCCTTGGACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAACGTAC
G

- Sequências de nucleotídeo relacionadas adicional que são con-
templadas dentro do escopo da invenção têm, por exemplo, alterações de
base oscilantes, uso de códon otimizado, sequências otimizadas para ex-
pressão de hospedeiro, por exemplo, modificações para remover as seqüên-
5 cias de encaixe secretas, e mutações conservadoras. Sequências de poli-
peptídeo relacionadas adicionais são contempladas dentro do escopo da
invenção que têm, por exemplo, alterações conservadoras de aminoácido,
ou contêm sequências de aminoácido adicionais tais como marcadores
6xHis ou outros marcadores são fundidas a uma segunda seqüência de poli-
10 peptídeo, ou contêm alterações de resíduo que reduzem a resposta imune
ao anticorpo terapêutico, ou que têm resíduos de FR1, FR2, FR3 ou FR4
modificados. regiões de FR e CDR são fornecidas nas FIGs. 1-3. Seqüên-
cias de CDR preferidas são como fornecidas nas Figuras.

Doenças dependentes de proteína cinase são doenças especí-

almente proliferativas, preferivelmente um tumor benigno ou especialmente maligno, mais preferivelmente carcinoma de cérebro, rim, fígado, glândula ad-renal, bexiga, mama, estômago (tumores especialmente gástricos), ovários, cólon, reto, próstata, pâncreas, pulmão, vagina, tiróide, sarcoma, glioblastomas, mieloma múltiplo ou câncer gastrintestinal, especialmente carcinoma de cólon ou adenoma colorretal, ou um tumor de pescoço e cabeça, uma hiperproliferação epidérmica, especialmente psoríase, hiperplasia da próstata, uma neoplasia, especialmente de caráter epitelial, preferivelmente carcinoma mamário, ou uma leucemia, especialmente até onde c-Met está envolvido. Eles podem provocar a regressão dos tumores e impedir a formação de metástase tumoral e o crescimento de (também micro)metastases. Além disso, eles podem ser usados em hiperproliferação epidérmica (por exemplo psoríase), em hiperplasia da próstata, no tratamento de neoplasias, especialmente de caráter epitelial, por exemplo carcinoma mamário, e em leucemias. É também possível usar os anticorpos da invenção no tratamento de doenças do sistema imune até então como várias ou, especialmente, proteína tirosina cinases individuais e / ou (também) proteína serina/treonina cinases estejam envolvidas; além disso, os anticorpos da invenção podem ser usados também no tratamento de doenças do sistema nervoso central ou periférico onde a transmissão de sinal por pelo menos uma proteína tirosina cinase e/ou (também) proteína serina/treonina cinase esteja envolvida.

Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento funcional deste anticorpo liga à proteína de c-Met alvo e modula, isto é, ativa ou inibe, fosforilação de c-Met. Em certas modalidades, ativação de fosforilação de c-Met estimula pelo menos uma dentre uma atividade selecionada do grupo de regeneração de órgão, cura de ferida, e regeneração de tecido. Em uma modalidade relacionada, o órgão é pele, rim, fígado, pâncreas, coração, pulmão, intestino, timo, ou tiróide. Em modalidades alternativas, anticorpos para c-Met bloquearia infecção de patógeno, particularmente infecção de *Listeria*, ou melhoraria as doenças patogênicas tais como malária (Carrolo, et al., Nature Med. 9: 1363-1369, 2003).

Anticorpos que mostram inibição c-Met são úteis no tratamento

de câncer de cólon, incluindo metástase, por exemplo no fígado, e carcinoma pulmonar de não-célula pequena. Anticorpos de Anti-cMet podem também ser usados no tratamento de carcinoma renal papilar hereditário (Schmidt, L., et al. *Nat. Genet.* 16, 68-73, 1997) e outras doenças proliferativas em que c-MET é supra-expressado ou constitutivamente ativado por mutações (Jeffers e Vande Woude. *Oncogene* 18, 5120-5125, 1999; e referência citada nele) ou rearranjos cromossômicos (por exemplo TPR-MET; Cooper et al. *Nature* 311, 29-33, 1984; Park. et al. *Cell* 45, 895-904, 1986). Antagonistas de anticorpo da invenção são especialmente úteis para tratar uma célula indesejada, em particular, uma célula associada a uma condição relacionada a c-Met tal como um câncer, uma metástase, ou uma condição inflamatória. Cânceres exemplares incluem, mas não são limitados a, por exemplo, esofágico, mama, rim incluindo mas não limitados a carcinoma de célula renal papilar, glioma, cabeça e pescoço, epitelial, pulmão, pele, leucemia, linfoma, mieloma, cérebro, pancreático, gástrico, gastrointestinal, estômago, intestino, cólon, fígado, genital, urinário, melanoma, e próstata. Cânceres e condições adicionais são fornecidos aqui ou conhecidos na técnica.

Também, anticorpos que mostram antagonismo de c-Met são úteis no tratamento de câncer de bexiga (superficial e invasivo muscular), câncer de mama, câncer cervical, câncer colorretal, glioma (incluindo glioblastoma, astrocitoma anaplásico, oligoastrocitoma, oligodendroglioma), câncer esofágico, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular (HCC) incluindo HCC infantil, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de cabeça e pescoço de célula escamosa, carcinoma nasofaríngeo), carcinoma de célula de Hurthle, melanoma maligno, mesotelioma, mieloma múltiplo, leucemias, câncer de pulmão de célula não-pequena (incluindo todos os subtipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa, carcinoma broncoalveolar, carcinoma de célula grande, e tipo adenoescamoso misturado), câncer de pulmão de célula pequena, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer de próstata, câncer de célula renal incluindo câncer de célula renal papilar hereditário e esporádico, Tipo I e Tipo II, e câncer de célula

renal de célula clara; sarcomas, em particular osteossarcoma, sarcomas de célula clara, e sarcomas de tecido macio (incluindo rabdomiossarcomas alveolares e embrionários, sarcomas alveolares de parte macia); carcinoma de tiróide (papilares e outros subtipos).

5 Em certas modalidades, a invenção fornece um método para tratar um distúrbio ou condição relacionada a c-Met que envolve administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de qualquer uma das composições farmacêuticas acima. O distúrbio ou condição é um
10 câncer ou uma condição inflamatória. Em outra modalidade relacionada, o câncer é esofagiano, mama, rim, cabeça e pescoço, epitelial, pulmão, leucemia, linfoma, mieloma, cérebro, pancreático, estômago, cólon, fígado, genital, urinário, melanoma, ou próstata. Em uma modalidade particular, o câncer é hepático ou esofagiano.

Em certas modalidades, qualquer um dos métodos acima envol-
15 ve também administrar um agente quimioterapêutico. Em uma modalidade relacionada, o agente quimioterapêutico é um agente anticâncer.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método para tratar uma célula indesejada que envolve contatar a célula com qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais destes anticorpos. Em uma
20 modalidade relacionada, a célula carrega um receptor de c-Met. Em outra modalidade relacionada, o método acima também envolve tratar a célula com um agente quimioterapêutico ou radiação.

Em uma modalidade alternativa, o anticorpo é responsivo e ativa fosforilação de c-Met que estimula uma resposta celular, tal como em cura
25 de ferimento.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica que inclui os anticorpos acima ou fragmentos funcionais destes anticorpos e um agente terapêutico adicional. O agente terapêutico adicional é selecionado do grupo que consiste em um agente anticâncer; um antibiótico; um agente antiinflamatório; um fator de crescimento; e uma citocina.
30

MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO QUE CODIFICAM ANTICORPOS DA INVENÇÃO

Outro aspecto da invenção refere-se às moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da invenção. Exemplos de seqüências de V_H estão mostrados nas SEQ ID NOs: 21-30. Exemplos de seqüências de V_L estão mostrados nas SEQ ID NOs: 1-20. Um exemplo de uma seqüência de nucleotídeo de Ig lambda é mostrado nas SEQ ID NOs: 73. Exemplos de Seqüência de nucleotídeo de Ig capa estão mostrados nas SEQ ID NOs: 74-76. Exemplos de seqüências de nucleotídeo de IgG4 estão mostrados nas SEQ ID NOs: 85-88.

Os ácidos nucléicos fornecidos aqui que codificam os anticorpos podem estar presentes em células inteiras, em um lisado de célula, ou podem ser ácidos nucléicos em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucléico é isolado ou tornado substancialmente puro quando purificado longe de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucléicos ou proteínas celulares, através de técnicas padrões, incluindo tratamento alcalino/SDS, bandagem de CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de agarose e similares bem conhecidos na técnica. Vide, F. Ausubel, et al., ed. 2006, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing e Wiley Interscience, Nova Iorque. Um ácido nucléico da invenção pode ser, por exemplo, DNA ou RNA e pode ou não conter seqüências intrônicas. Em uma modalidade, o ácido nucléico é uma molécula de cDNA. O ácido nucléico pode estar presente em um vetor tal como um vetor de exibição de fago, ou em um vetor de plasmídeo recombinante.

Os ácidos nucléicos da invenção podem ser obtidos usando técnicas de biologia molecular padrões. Para anticorpos expressos por hibridomas (por exemplo, hibridomas preparados de camundongos transgênicos portando genes de imunoglobulina humana como descritos mais abaixo), os cDNAs que codificam as cadeias leves e pesadas do anticorpo feitos pelo hibridoma podem ser obtidos por técnicas padrões de amplificação de PCR ou clonagem de cDNA. Para anticorpos obtidos de uma biblioteca de genes de imunoglobulina (por exemplo, usando técnicas de exibição de fago), ácido nucléico que codifica o anticorpo pode ser restabelecido de vários clones de

fago que são membros da biblioteca.

Uma vez fragmentos de DNA que codificam segmentos de V_H e V_L são obtidos, estes fragmentos de DNA podem ser também manipulados por técnicas de DNA recombinantes padrões, por exemplo para converter os genes de região variável para genes de cadeia de anticorpo de comprimento total, para genes de fragmento de FAB ou para um gene de scFv ligado aos nucleotídeos de codificação nos vetores conhecidos. Nestas manipulações, um fragmento de DNA de codificação de V_L ou V_H é operativamente ligado a outra molécula de DNA, ou a um fragmento que codifica outra proteína, tal como uma região constante do anticorpo ou um ligador flexível. O termo "operativamente ligado", como usado neste contexto, é intencionado significar que os dois fragmentos de DNA são unidos de uma maneira funcional, por exemplo, de modo que as seqüências de aminoácido codificadas pelos dois fragmentos de DNA permaneçam dentro da estrutura, ou de modo que a proteína seja expressa sob controle de um promotor desejado.

O DNA isolado que codifica a região de V_H pode ser convertido em um gene de cadeia pesada de comprimento total operativamente ligando ao DNA de codificação de V_H a outra molécula de DNA que codifica regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As seqüências dos genes de região constante de cadeia pesada humana são conhecidos na técnica (vide por exemplo, Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242) e os fragmentos de DNA que abrangem estas regiões podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD. Para um fragmento de gene de cadeia pesada de Fab, o DNA de codificação de V_H pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA que codifica apenas a cadeia pesada CH1 região constante.

O DNA isolado que codifica a região de V_L pode ser convertido para um gene de cadeia leve de comprimento total (como também para um gene de cadeia leve de Fab) operativamente ligando o DNA de codificação

de V_L a outra molécula de DNA que codifica a região constante de cadeia leve, C_L . As seqüências dos genes de região constante de cadeia leve humana são conhecidas na técnica (vide por exemplo, Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U. S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242) e os
5 fragmentos de DNA que abrangem estas regiões podem ser obtidas por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante capá ou uma lambda.

Para criar um gene de scFv, os fragmentos de DNA de codificação de V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um ligador flexível, por exemplo, codificando a seqüência de aminoácido (Gly4-Ser)₃, de modo que as seqüências de V_H e V_L podem ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões de V_L e V_H unidas pelo ligador flexível (vide por exemplo, BIRD et al., 1988 Science
10 242:423-426; Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990 Nature 348:552-554).

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS DA INVENÇÃO

Anticorpos monoclonais (mAbs) podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional por exemplo, a técnica de hibridação de célula somática padrão de
20 Kohler e Milstein, 1975 Nature 256: 495. Muitas técnicas podem ser empregadas para produzir anticorpo monoclonal por exemplo, transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

Um sistema animal para preparar hibridomas é o sistema murino. Produção de hibridoma no camundongo é um procedimento bem estabelecido. Protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Pares de fusão (por exemplo, células de mieloma murino) e procedimentos de fusão são também conhecidos.

30 Anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na seqüência de um anticorpo monoclonal murino preparada como descrito acima. DNA que codifica as imunoglobuli-

nas de cadeia leve e pesada pode ser obtido do hibridoma murino de interesse e pode ser engenheirado para conter seqüências de imunoglobulina não-murina (por exemplo, humana) usando técnicas padrões de biologia molecular. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis murinas podem ser ligadas às regiões constantes humanas usando métodos conhecidos na técnica (vide por exemplo, Patente U. S. No. 4.816.567 para Cabilly et al.). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões de CDR murinas podem ser inseridas em uma estrutura humana usando métodos conhecidos na técnica (vide por exemplo, Patente U. S. No. 5.225.539 para Winter, e patentes U. S. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 para Queen et al.)

Em uma certa modalidade, os anticorpos da invenção são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos direcionados contra c-Met podem ser gerados usando camundongos transgênicos ou transcromossômicos portando partes do sistema imune humano ao invés do sistema de camundongo. Estes camundongos transgênicos e transcromossômicos incluem camundongos referidos aqui como camundongos HuMAb e camundongos KM, respectivamente, e são coletivamente referidos aqui como "camundongos de Ig humana".

O HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) contém miniloci de gene de imunoglobulina humana que codifica as seqüências de imunoglobulina humana de cadeia pesada e leve κ não-rearranjadas (μ e γ), junto com mutações alvegadas que inativam os loci endógenos das cadeias μ e γ (vide por exemplo, Lonberg, et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859). Conseqüentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM de camundongo ou κ , e em resposta à imunização, os transgenes de cadeia leve e pesada humanos introduzidos sofrem troca de classe e mutação somática para gerar IgG κ humana de afinidade alta monoclonal (Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. e Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol.13: 65-93, e Harding, F. e Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). A preparação e uso de camundongos HuMAb, e as modificações genômicas carregadas por tais camundongos, é também des-

crita em Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; e Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851, os conteúdos de tudo são especificamente incorporados por este meio por referência em sua totalidade. Vide também, patentes U. S. Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; todas para Lonberg e Kay; patente U. S. No. 5.545.807 para Surani et al.; Publicações de PCT Nos. WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todas para Lonberg e Kay; e Publicação de PCT No. WO 01/14424 para Korman et al.

Em outra modalidade, produção dos anticorpos humanos da invenção pode ser suscitada ("levantada") usando um camundongo portando seqüências de imunoglobulina humana em transgenes e transcromossomos tais como um camundongo portando um transgene de cadeia pesada humana e um transcromossoma de cadeia leve humano. Tais camundongos, referidos aqui como "camundongos KM", são descritos em detalhes na Publicação de PCT WO 02/43478 para Ishida et al.

Ainda também, sistemas de animais transgênicos alternativos que expressam genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser usados para levantar anticorpos de anti-c-Met da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo referido como o Xenomouse (Abgenix, Inc.) pode ser usado; tais camundongos são descritos, por exemplo, nas patentes U. S. Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 e 6.162.963 para Kucherlapati et al.

Além disso, sistemas de animais transcromossômicos alternativos que expressam genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser usados para levantar anticorpos de anti-c-Met da invenção. Por exemplo, camundongos portando um transcromossoma de cadeia

pesada humano e um transcromossoma de cadeia leve humano, referido como "camundongos TC" podem ser usados; tais camundongos são descritos em Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Além disso, vacas portando os transcromossomos de cadeia pesada e leve humanos foram descritos na técnica (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894) e pode ser usados para levantar anticorpos de anti-c-Met da invenção.

Anticorpos humanos ou anticorpos monoclonais humanos podem também ser preparados usando métodos de exibição de fago para triar bibliotecas de genes de imunoglobulina humana. Tais métodos de exibição de fago para identificar e clonar anticorpos humanos são estabelecidos na técnica. Vide por exemplo: patentes U. S. Nos. 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 para Ladner et al.; Patentes U. S. Nos. 5.427.908 e 5.580.717 Dotar et al.; Patentes U. S. Nos. 5.969.108 e 6.172.197 para McCafferty et al.; e patentes U. S. Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 e 6.593.081 para Griffiths et al.

Anticorpos monoclonais humanos da invenção podem também ser preparados usando camundongos SCID nos quais foram reconstituídas células imunes humanas de modo que uma resposta de anticorpo humano pode ser gerada sob imunização. Tais camundongos são descritos, por exemplo, nas patentes U. S. Nos. 5.476.996 e 5.698.767 para Wilson et al.

GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS CONTRA c-Met

c-Met purificado, recombinante, extracelular, humano expresso em *E. coli* (R & D Systems, Mineápolis, MN), ou c-Met purificado, recombinante, humano conjugado com hemocianina de lapa (KLH), é usado como o antígeno. Outras fontes de c-Met expressados são também contempladas como estando dentro do escopo da invenção, incluindo, por exemplo, cMet isolado de sistemas de expressão tais como baculovírus, células de CHO, e outro conhecido a alguém versado nas técnicas.

Anticorpos monoclonais completamente humanos para c-Met são preparados usando cepas de HCo7, HCo12 e HCo17 de camundongos transgênicos HuMab e cepa de KM de camundongos transcromossômicos

transgênicos, cada um destes expressam genes de anticorpo humano. Em cada uma destas cepas de camundongo, o gene de cadeia leve capa de camundongo endógeno pode ser homozigualmente rompido como descrito em Chen et al., 1993 EMBO J.12:811-820 e o gene de cadeia pesada de camundongo endógeno pode ser homozigualmente rompido como descrito no Exemplo 1 da Publicação de PCT WO 01109187. Cada uma destas cepas de camundongo carregam um transgene humano de cadeia leve capa, KCo5, como descrito em Fishwild et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851. A cepa de HCo7 carrega o transgene humano de cadeia pesada HCo7 como descrito nas patentes U. S. Nos. 5.545.806; 5.625.825; e 5.545.807. A cepa de HCo12 carrega o transgene humano de cadeia pesada HCo12 como descrito no Exemplo 2 da Publicação de PCT WO 01/09187. A cepa de HCo17 carrega o transgene humano de cadeia pesada HCo17. A cepa de KNM contém o transcromossoma de SC20 como descrito em Publicação de PCT WO 02/43478.

Para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos para c-Met, camundongos HuMab e camundongos KM são imunizados com domínio extracelular de c-Met purificado recombinante expresso em *E. coli* ou com c-Met-KLH conjugado como antígeno. Esquemas de imunização geral para camundongos HuMab são descritos em Lonberg, N., et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D., et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851 e Publicação de PCT WO 98/24884. Os camundongos têm 6-16 semanas de idade na primeira infusão do antígeno. Uma preparação recombinante purificada (5-50 µg) de antígeno de c-Met (por exemplo, purificado de células de *E. coli* transfeccionadas que expressam domínio extracelular de c-Met) é usada para imunizar os camundongos HuMab e camundongos KM de maneira intraperitoneal, subcutaneamente (Sc) ou através de injeção nas patas.

Camundongos transgênicos são imunizados duas vezes com antígeno no adjuvante de Freund completo ou adjuvante de Ribi de maneira intraperitoneal (IP), subcutaneamente (Sc) ou através das patas (FP), seguido por 3-21 dias imunização IP, Sc ou FP (até um total de 11 imunizações)

com o antígeno em adjuvante de Freund incompleto ou de Ribi. A resposta imune é monitorada através de sangria retro-orbital. O plasma é triado por ELISA, e camundongos com titulações suficientes de imunoglobulina humana de anti-c-Met são usados para fusões. Os camundongos são reforçados intravenosamente com antígeno 3 e 2 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Tipicamente, 10-35 fusões para cada antígeno são executadas. Várias dúzias de camundongos são imunizadas para cada antígeno. Um total de 82 camundongos das cepas de HCo7, HCo12, HCo17 e KM de camundongos é imunizado com c-Met.

10 Para selecionar camundongos HuMab ou KM produzindo anticorpos que ligam c-Met, soros de camundongos imunizados podem ser testados por ELISA como descrito por Fishwild, D., et al., 1996. Brevemente, em um protocolo exemplar, placas de microtitulação são revestidas com c-Met purificado recombinante de *E. coli* a 1-2 µg / ml em PBS, 50 µl/poços, 15 incubadas 4º C durante a noite depois bloqueadas com 200 µl/poço de 5 % soro de galinha em PBS/Tween (0,05 %). Outras concentrações e fontes alternativas podem também ser usadas. Diluições de plasma dos camundongos c-Met-imunizados são adicionadas a cada poço e incubados durante 1-2 horas em temperatura ambiente. As placas são lavadas com PBS/Tween 20 e depois incubadas com um anticorpo policlonal de Fc de IgG anti-humana de cabra conjugado com peroxidase de raiz-forte (HRP) durante 1 hora em temperatura ambiente. Após lavar, as placas são desenvolvidas com substrato de ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) e analisadas através de espectrofotômetro a um comprimento de onda λ de 415-495 nm. Alternativamente, 25 outros tipos de detecção são possíveis, e podem ser fornecidos por alguém versado na técnica. Camundongos que desenvolvem as titulações mais altas de anticorpos de anti-c-Met são usados para obter células para fusões. Fusões são executadas e sobrenadantes de hibridoma são testados para atividade de anti-c-Met por ELISA.

30 Esplenócitos de camundongo isolados dos camundongos HuMab e camundongos KM são fundidos em uma linhagem celular de mieloma de camundongo com base nos protocolos padrões usando PEG. Os hibri-

domas resultantes são depois triados para produção de anticorpos antígeno-específicos. As suspensões de célula simples de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados são fundidas com um quarto do número de células de mieloma de camundongo não-segregadas SP2/0 (ATCC, CRL 1581) com 50 % de PEG (Sigma). Células são colocadas em placas em aproximadamente 1×10^5 /poço em placa de microtitulação de fundo chato, seguido por aproximadamente incubação de duas semanas em meio seletivo contendo 10 % soro bovino fetal, 10 % P388D 1 (ATCC, CRL TIB-63) meio condicionado, 3-5 % fator de clonagem Origen® (IGEN) em DMEM (Mediatech, CRL 10013, com glicose alta, L-glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-mercaptoetanol, 50 mg/l gentamicina e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Após 1-2 semanas, as células foram cultivadas em meio em que HAT é substituído com HT. Poços individuais são depois triados por ELISA para anticorpos monoclonais de anti-c-Met de IgG humana. Uma vez crescimento de hibridoma extensivo ocorreu, o meio é usualmente monitorado após 10-14 dias. Os hibridomas de segregação de anticorpo são re-colocados na placa, triados novamente e, se ainda positivo para IgG humana, os anticorpos monoclonais de anti-c-Met são subclonados pelo menos duas vezes limitando a diluição. Os subclones estáveis são depois cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização adicional.

IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS DE IG HUMANA

Camundongos de Ig humana usados para levantar anticorpos humanos da invenção, são imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno de c-Met e/ou c-Met recombinante, ou uma proteína de c-Met de fusão, como descrita por Lonberg, N., et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D., et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851; e Publicação de PCT WO 98124884 e WO 01/14424. Os camundongos têm 6-16 semanas de idade na primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou recombinante (5-50 μ g) de antígeno de c-Met é usada para imunizar os camundongos de Ig humana intraperitonealmente.

Procedimentos detalhados para gerar anticorpos monoclonais

completamente humanos para c-Met são descritos acima. Experiência cumulativa com vários antígenos mostrou que os camundongos transgênicos respondem quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) com antígeno no adjuvante de Freund completo, seguido por imunizações IP (até um

5 total de 6) com antígeno no adjuvante de Freund incompleto a cada duas semanas. Porém, adjuvantes diferentes de Freund são também observados ser eficazes. Além disso, células inteiras são observadas na ausência de adjuvante ser altamente imunogênicas. A resposta imune pode ser monitorada no curso do protocolo de imunização com amostras de plasma que são

10 obtidas através de sangria retro-orbital. O plasma pode ser triado por ELISA, e camundongos com titulações suficientes de imunoglobulina humana de anti-c-Met podem ser usados para fusões. Os camundongos podem ser reforçados intravenosamente com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. É esperado que 2-3 fusões para cada imunização possam necessitar ser executadas. Entre 6 e 24 camundongos são tipicamente imuni-

15 zados para cada antígeno. Usualmente cepas de HCo7 e HCo12 são usadas. Além disso, 12 transgenes de HCo7 e HCo podem ser criados juntamente em um camundongo só tendo dois transgenes de cadeia pesada humanos diferentes (HCo7/HCo12).

20 GERAÇÃO DE HIBRIDOMAS QUE PRODUZEM ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS

Para gerar hibridomas que produzem anticorpos monoclonais humanos da invenção, esplenócitos e/ou células de linfonodo de camundongos imunizados são isolados e fundidos em uma linhagem celular imortalizada apropriada, tal como uma linhagem celular de mieloma de camundongo.

25 Os hibridomas resultantes são triados para a produção de anticorpos antígeno-específicos. Por exemplo, suspensões de célula simples de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados são fundidas com um sexto de várias células não-segregantes de mieloma de camundongo P3X63-Ag8.653

30 (ATCC, CRL 1580) com 50 % PEG. Em uma modalidade exemplar, as células são colocadas em placa de microtitulação de fundo chato, seguido por uma incubação de duas semanas em meio seletivo contendo 20 % Soro de

Clone fetal, 18 % "653" meios condicionados, 5 % Origen® (IGEN), 4 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina, 50 µg/ml gentamicina e 1X HAT (Sigma; HAT é adicionado 24 horas após a fusão). Após aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas em meio em que HAT é substituído com HT. Poços individuais podem ser depois triados por ELISA para anticorpos de IgM e IgG monoclonais humanas. Uma vez crescimento de hibridoma extensivo ocorre, o meio pode ser analisado, usualmente após 10-14 dias. Os hibridomas segregantes de anticorpo podem ser re-colocados na placa, triados novamente, e se ainda positivo para IgG humana, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes limitando a diluição. Os subclones estáveis podem ser depois cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização.

Para purificar anticorpos monoclonais humanos, os hibridomas selecionados são crescidos em frascos spinner de dois litros para purificação do anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes são filtrados e concentrados por cromatografia de afinidade com proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). IgG eluída é verificado por eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para assegurar pureza. A solução de tampão é trocada para PBS, e a concentração é determinada por OD₂₈₀ usando extinção de um coeficiente 1,43. Os anticorpos monoclonais são aliquotados e armazenados a -80° C.

GERAÇÃO DE TRANSFECTOMAS PRODUCING ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos da invenção são também produzidos em um transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção de gene como são bem conhecidos na técnica (por exemplo, Morrison, S., (1985) Science 229:1202).

Por exemplo, para expressar os anticorpos, ou fragmentos de anticorpo dos mesmos, DNAs que codificam cadeias leves e pesadas de

comprimento parcial ou total, podem ser obtidos através de técnicas de biologia molecular padrões (por exemplo, Amplificação de PCR ou clonagem de cDNA usando um hibridoma que expressa o anticorpo de interesse) e os DNAs podem ser inseridos nos vetores de expressão de modo que os genes sejam operativamente ligados às seqüências de controle transcricionais e translacionais. Neste contexto, o termo "operativamente ligados" é intencionado significar que um gene de anticorpo é ligado em um vetor de modo cujas seqüências de controle transcricionais e translacionais dentro do vetor servem para função intencionada de regular a transcrição e translação do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as seqüências de controle de expressão são selecionados para ser compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de anticorpo cadeia leve e o gene de anticorpo de cadeia pesada podem ser inseridos em vetor separado ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão através de métodos padrões (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento de gene de anticorpo e vetor, ou ligação de extremidade cega se nenhum sítio de restrição estiver presente). As regiões variáveis de cadeia leve e pesada dos anticorpos descritos aqui podem ser usadas para criar genes de anticorpo de comprimento total de qualquer isótipo de anticorpo inserindo-os em vetores de expressão que já codificam regiões constantes de cadeia pesada e constantes de cadeia leve do isótipo desejado de modo que o segmento de V_H seja operativamente ligado ao(s) segmento(s) de CH dentro do vetor e o segmento de V_L seja operativamente ligado ao segmento de C_L dentro do vetor. Adicionalmente ou como alternativa, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor de modo que o peptídeo sinal é ligado dentro da estrutura ao término amino do gene de cadeia de anticorpo. O peptídeo sinal pode ser um peptídeo sinal de imunoglobulina ou um peptídeo sinal heterólogo (isto é, um peptídeo sinal de uma proteína de não-imunoglobulina).

Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da invenção carregam seqüências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo em uma célula hospedeira. O termo "seqüência reguladora" é intencionado incluir os promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou translação dos genes de cadeia de anticorpo. Tais seqüências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology. 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Será apreciado por aqueles versados na técnica que o projeto do vetor de expressão, incluindo a seleção das seqüências reguladoras, pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, etc. Seqüências reguladoras para expressão de célula hospedeira mamífera incluem elementos virais que direcionam níveis altos de expressão de proteína para células mamíferas, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de citomegalovírus (CMV), Símio Vírus 40 (SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)), e políoma. Alternativamente, seqüências reguladoras não-virais podem ser usadas, tais como o promotor de ubiquitina ou promotor de P-globina. Ainda também, elementos reguladores compostos de seqüências de fontes diferentes, tais como o sistema de promotor de SRa contendo seqüências do promotor prematuro de SV40 e a repetição terminal longa do vírus de leucemia de célula T humano tipo 1 (Takebe, Y., et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Além dos genes de cadeia de anticorpo e seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem carregar seqüências adicionais, tais como seqüências que regulam a replicação do vetor nas células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes de marcador selecionável. O gene de marcador selecionável facilita a seleção das células hospedeiras às quais o vetor foi introduzido (vide, por exemplo, Pats. U. S. Nos. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todas por Axel et al.). Por exemplo, o gene de marcador selecionável tipicamente confere re-

sistência a fármacos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira à qual o vetor foi introduzido. Genes de marcador selecionável incluem o gene de diidrofolato reductase (DHFR) (para uso em células hospedeiras de dhfr com seleção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para seleção de G418).

Para expressão das cadeias leves e pesadas, o(s) vetor(es) de expressão codificando as cadeias pesadas e leves são transfeccionados em uma célula hospedeira através de técnicas padrões. As várias formas do termo "transfecção" são intencionadas abranger uma ampla variedade de técnicas comumente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção de DEAE-dextrana e outras. É teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas. Expressão de anticorpos em células eucarióticas, em particular células hospedeiras mamíferas, é debatida porque tais células eucarióticas, e em particular células mamíferas, são mais prováveis que células procarióticas para montar e segregar um anticorpo corretamente dobrado e imunologicamente ativo. Expressão procariótica dos genes de anticorpo foi relatada ser ineficaz para produção de rendimentos altos de anticorpo ativo (Chefe, M. A. e Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13).

Células hospedeiras mamíferas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), incluindo células dhfr-CHO, descritas em Urlaub e Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 usadas com um marcador selecionável de DHFR, por exemplo, como descrito em R.J. Kaufman e P. A. Sharp 1982 Mol. Biol. 159:601-621, células de mieloma de NSO, células COS e células SP2. Em particular, para o uso com células de mieloma de NSO, outro sistema de expressão é o sistema de expressão de gene de GS mostrado em WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338.841. Quando vetores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpo são introduzidos nas células hospedeiras mamíferas, os anticorpos são produzidos cultivando

- as células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras são crescidas. Anticorpos podem ser restabelecidos do meio de cultura usando métodos de purificação
- 5 de proteína padrões.

IMUNOCONJUGADOS

- Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza um anticorpo de anti-c-Met, ou um fragmento do mesmo, conjugado com uma metade terapêutica, tal como uma citotoxina, um fármaco (por exemplo, um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Tais conjugados são referidos aqui como "imunoconjugados". Imunoconjugados que incluem uma ou mais citotoxinas são referidos como "imunotoxina". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial (por exemplo, mata) às células. Exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorrubicina, de diidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotestosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Agentes terapêuticos também incluem, por exemplo, antimetabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, arabinosida de citosina, decarbazina de 5-fluorouracila), agentes de ablação (por exemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina, antraciclinas (por exemplo, daunorrubicina (antigamente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (antigamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina).
- 10
15
20
25

- Outros exemplos de citotoxinas terapêuticas que podem ser conjugadas com um anticorpo da invenção incluem duocarmicinas, caliqueamicinas, maytansinas e auristatinas, e derivados das mesmas. Um exemplo de um conjugado de anticorpo de caliqueamicina está comercialmente disponível.
- 30

vel (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

5 Citoxinas podem ser conjugadas com anticorpos da invenção usando tecnologia de ligador disponível na técnica. Exemplos de tipos de ligador que foram usados para conjugar uma citotoxina com um anticorpo incluem, mas não são limitados a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, dissulfetos e ligadores contendo peptídeo. Um ligador pode ser selecionado que é, por exemplo, suscetível à clivagem por pH baixo dentro do compartimento lisossomal ou suscetível à clivagem através de proteases, tais como proteases preferencialmente expressas em tecido de tumor tais como catepsinas (por exemplo, catepsinas B, C, D).

10 Para mais debate dos tipos de citotoxinas, ligadores e métodos para conjugar agentes terapêuticos para anticorpos, vide também Saito, G., et al., 2003 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P. A. et al., 2003 *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G., 2003 *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T. M., 2002 *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. e Kreitman, R. J., 2002 *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P. D. e Springer, C. J., 2001 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

20 Anticorpos da presente invenção podem também ser conjugados com um isótopo radioativo para gerar radiofarmacêuticos citotóxicos, também referidos como radioimunoconjugados. Exemplos de isótopos radioativos que podem ser conjugados com os anticorpos para uso de modo diagnóstico ou terapêuticamente podem incluir, mas não são limitados a, iodo¹³¹, índio¹¹¹, ítrio⁹⁰, e lutétio¹⁷⁷. Método para preparar radioimunoconjugados é estabelecido na técnica. Exemplos de radioimunoconjugados estão comercialmente disponíveis, incluindo Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) e Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), e métodos similares podem ser usados para preparar radioimunoconjugados usando os anticorpos da invenção.

30 Os conjugados de anticorpo da invenção podem ser usados para modificar uma resposta biológica dada, e a metade de fármaco não será interpretada como limitada a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a metade de fármaco pode ser uma proteína ou polipeptídeo que possua uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por

exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa, ou fragmento ativo da mesma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, ou toxina de *Diphtheria*; uma proteína tal como fator de necrose tumoral ou interferona γ ; ou, modificadores de resposta biológica tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), ou outros fatores de crescimento.

Técnicas para conjugar tal metade terapêutica para anticorpos são bem conhecidas, vide, por exemplo, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", em *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

MOLECULAS BIESPECÍFICAS

Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza moléculas biespecíficas compreendendo um anticorpo de anti-c-Met, ou um fragmento do mesmo, da invenção. Um anticorpo da invenção, ou porções de ligação de antígeno do mesmo, pode ser derivatizado ou ligado a outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína (por exemplo, outro anticorpo ou ligando a um receptor) para gerar uma molécula biespecífica que liga pelo menos a dois sítios de ligação diferentes ou moléculas alvo. O anticorpo da invenção pode ser de fato derivatizado ou ligado a mais de uma outra molécula funcional para gerar moléculas multiespecíficas que ligam a mais de dois sítios de ligação diferentes e/ou moléculas alvo; tais moléculas

multiespecíficas são também intencionadas ser abrangidas pelo termo "molécula biespecífica" como aqui usado. Para criar uma molécula biespecífica da invenção, um anticorpo da invenção pode ser ligado funcionalmente (por exemplo, através de acoplamento químico, fusão genética, associação não-covalente ou do contrário) a uma ou mais outras moléculas de ligação, tais como outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou ligação mimético, de modo que uma molécula biespecífica resulte.

Em certas modalidades, moléculas biespecíficas são direcionadas contra outras tirosina cinases de receptor, incluindo mas não limitado a, por exemplo, cRon ou EGFR, ou outros alvos na via de cMet. Alvos de molécula biespecífica adicionais incluem receptores e ligantes alvejados para terapêuticas anticâncer, tais como aquelas fornecidas aqui.

Conseqüentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas compreendendo pelo menos uma primeira especificidade de ligação para c-Met e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítipo alvo. Por exemplo, o segundo epítipo alvo é um receptor de Fc, por exemplo, FcγRI humano (CD64) ou um receptor de Fcα humano (CD89). Portanto, a invenção inclui moléculas biespecíficas capazes de ligar células efetoras expressando FcγR, FcαR ou FcεR (por exemplo, monócitos, macrófagos ou células polimorfonucleares (PMNs), e alvejar células que expressam c-Met. Estas moléculas biespecíficas alvejam células expressando c-Met para célula efetora e desencadeiam atividades de célula efetora mediadas por receptor Fc, tais como fagocitose de umas células expressando c-Met, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), liberação de citocina, ou geração de ânion de superóxido.

Adicionalmente, para a invenção em que a molécula biespecífica é multiespecífica, a molécula pode também incluir uma terceira especificidade de ligação, além de uma especificidade de ligação de anti-Fc e uma especificidade de ligação de anti-c-Met. Por exemplo, a terceira especificidade de ligação poderia ser uma porção de fator de anti-intensificação (EF), por exemplo, uma molécula que liga a uma proteína de superfície envolvida na atividade citotóxica e assim aumenta a resposta imune contra a célula alvo.

A "porção de fator de anti-intensificação" poderia ser um anticorpo, fragmento de anticorpo funcional ou um ligante que liga a uma molécula dada, por exemplo, um antígeno ou um receptor, e assim resulta em uma intensificação do efeito dos determinantes de ligação ao receptor de Fc ou antígeno de
5 célula alvo.

A "porção de fator de anti-intensificação" pode ligar um receptor de Fc ou um antígeno de célula alvo. Alternativamente, a porção de fator de anti-intensificação poderia ligar a uma entidade que é diferente da entidade à qual as primeira e segunda especificidades de ligação ligam. Por exemplo, a
10 porção de fator de anti-intensificação pode ligar uma célula T citotóxica (por exemplo por CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD44, ICAM-1 ou outra célula imune que resulte em uma resposta imune aumentada contra a célula alvo).

Em uma modalidade, as moléculas biespecíficas da invenção compreendem como uma especificidade de ligação pelo menos um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, incluindo, por exemplo, um
15 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ou uma cadeia simples de Fv. O anticorpo pode também ser um dímero de cadeia leve ou de cadeia pesada, ou qualquer fragmento mínimo do mesmo tal como um Fv ou uma construção de cadeia simples como descrita em Ladner et al. Patente U. S. No. 4.946.778, os conteúdos desta são expressamente incorporados por referência.
20

Em uma modalidade, a especificidade de ligação para um receptor de Fcγ é fornecida por um anticorpo monoclonal, a ligação desta não é bloqueada pela imunoglobulina humana G (IgG). Como aqui usado, o termo "receptor de IgG" refere-se a quaisquer dos oito genes de cadeia γ localiza-
25 dos no cromossomo 1. Estes genes codificam um total de doze isoformas de transmembrana ou de receptor solúveis que são agrupadas em três classes de receptor Fγ : FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e FcγRIII (CD 16). Em outra modalidade, o receptor Fcγ é um FcγRI humano de afinidade alta. FcγRI humano é uma molécula de 72 KDa, e tem afinidade alta por IgG monomérica
30 ca (10^8 - 10^9 M⁻¹).

A produção e caracterização de certos anticorpos monoclonais de anti-Fcγ são descritas por Fanger et al. na Publicação de PCT WO

88/00052 e na patente U. S. No. 4.954.617, os ensinamentos destas são completamente aqui incorporados por referência. Estes anticorpos ligam a um epítopo de FcγRI, FcγRII ou FcγRIII em um sítio que é distinto do sítio de ligação do receptor Fcγ e, desse modo, sua ligação não é bloqueada substancialmente por níveis fisiológicos de IgG. Anticorpos de anti-FcγRI específicos úteis nesta invenção são mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 e mAb 197. O hibridoma produzindo mAb 32 está disponível da American Type Culture Collection, acesso de ATCC No. HB9469. Em outras modalidades, o anticorpo de receptor anti-Fcγ é uma forma humanizada do anticorpo monoclonal 22 (H22). A produção e caracterização do anticorpo H22 são descritas em Graziano, R. F. et al., 1995 J. Immunol 155 (10): 4996-5002 e Publicação de PCT WO 94/10332. O anticorpo 1122 produzindo a linhagem celular foi depositado na American Type Culture Collection sob a designação HA022CL1 e tem o acesso no. CRL 11177.

Em ainda outras modalidades, a especificidade de ligação para um receptor de Fc é fornecida por um anticorpo que liga a um receptor de IgA humano, por exemplo, um receptor de Fc-alfa FcγRI (CD89), a ligação deste não tem que ser bloqueada pela imunoglobulina humana A (IgA). O termo "receptor de IgA" é intencionado incluir o produto de gene de um gene (FcγRI) localizado no cromossomo 19. Este gene é conhecido codificar várias isoformas de transmembrana alternativamente juntadas de 55 a 110 KDa. FcγRI (CD89) é constitutivamente expresso em monócitos/macrófagos, granulócitos eosinofílicos e neutrofílicos, mas não em populações de célula não-efetoras. FcγRI tem uma afinidade intermediária ou média ($5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) para IgA1 e IgA2, que é aumentada sob exposição a citocinas G-CSF ou GM-CSF (Morton, H. C. et al., 1996 Critical Reviews in Immunology 116:423-440). Quatro anticorpos monoclonais FcγRI-específicos, identificados como A3, A59, A62 e A77 que ligam FcγRI fora do domínio de ligação de ligante de IgA foi descrito (Monteiro, R. C. et al., 1992 J. Immunol. 148:1764).

FcγRI e FcγRI são receptores acionadores para o uso nas moléculas biespecíficas da invenção porque eles são expressos primariamente em células efetoras imunes, por exemplo, monócitos, PMNs, macrófagos e

células dendríticas; expressos em níveis altos (por exemplo, 5,000-100.000 por célula); mediadores de atividades citotóxicas (por exemplo, ADCC, fagocitose); medeiam apresentação de antígeno intensificada dos antígenos, incluindo auto-antígenos, alvejados para eles.

5 Outros anticorpos que podem ser empregados nas moléculas biespecíficas da invenção são anticorpos monoclonais murinos, quiméricos e humanizados.

 As moléculas biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas conjugando as especificidades de ligação constituintes, por exemplo, as especificidades de ligação de anti-FcR e anti-c-Met, usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica pode ser gerada separadamente e depois conjugadas uma com a outra. Quando as especificidades de ligação forem proteínas ou peptídeos, uma variedade de agentes acopladores ou reticulantes pode ser usada para conjugação covalente. Exemplos de agentes reticulantes incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), e sulfossuccinimidil 4-(N-maleimidometil)cicloexano-l-carboxilato (sulfo-SMCC) (vide por exemplo, Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Outros métodos incluem aqueles descritos em Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83), e Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Agentes de conjugação são SATA e sulfo-SMCC, ambos disponíveis de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

 Anticorpos são conjugados por ligação de sulfidrilas das regiões de dobradiça de término C das duas cadeias pesadas. Em uma modalidade particular, a região de dobradiça é modificada para conter um número estranho de resíduos de sulfidrilas, por exemplo um, por conjugação.

30 Alternativamente, genes que codificam ambas as especificidades de ligação podem ser engenheirados no mesmo vetor e podem ser expressos e montados, por exemplo, como uma proteína de fusão, na mesma

célula hospedeira. Este método é particularmente útil onde a molécula biespecífica for um mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligante x proteína de fusão de Fab. Uma molécula biespecífica da invenção pode ser uma molécula de cadeia simples que compreende um anticorpo de cadeia simples e
 5 um determinante de ligação, ou uma molécula biespecífica de cadeia simples que compreende dois determinantes de ligação. Moléculas biespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia simples. Métodos para preparar moléculas biespecíficas são descritos, por exemplo, na patente U. S. Número 5.260.203; patente U. S. Número 5.455.030; patente U. S. Número 4.881.175; patente U. S. Número 5.132.405; patente U. S. Número 5.091.513; patente U. S. Número 5.476.786; patente U. S. Número 5.013.653; patente U. S. Número 5.258.498; e patente U. S. Número 5.482.858.

Ligação das moléculas biespecíficas a seus alvos específicos
 15 pode ser confirmada, por exemplo, através de ensaio de imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (ERA), análise de FACS, bioensaio (por exemplo, inibição de crescimento), ou ensaio de Western blot. Cada um destes ensaios em geral detecta a presença de complexos de proteína-anticorpo de interesse particular empregando um reagente marcado (por exemplo, um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por exemplo, os complexos de anticorpo de FcR podem ser detectados usando por exemplo, um anticorpo ligado à enzima ou fragmento de anticorpo que reconhece e especificamente liga aos complexos de anticorpo-FcR. Alternativamente, os complexos podem ser detectados usando qualquer um de uma
 20 variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, o anticorpo pode ser radioativamente marcado e usado em um radioimunoensaio (RIA) (vide, por exemplo, Weintraub; B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Couser on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, março, 1986 que é incorporada aqui por referência). O isótopo radioativo pode ser
 25 detectado por tais meios como o uso de um contador γ ou um contador de cintilação ou através de auto-radiografia.

30 ENSAIOS PARA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE c-Met (AGONISMO OU

ANTAGONISMO)

Os anticorpos de anti-c-Met são ensaiados por ter uma habilidade agonística ou antagonística de c-Met. Agonismo é a habilidade para substituir o efector positivo HGF ligando e ativando c-Met, por exemplo, um receptor de c-Met humano carregado em uma célula de uma linhagem celular estabelecida em cultura, ou carregado em uma linhagem celular primária estabelecida de uma amostra de tecido humano, ou proteína de c-Met purificada que está comercialmente disponível (R&D Systems #358 MT) que é imobilizada em uma placa de ensaio ou em uma conta. Uma medida da atividade agonística é a concentração do efector, neste caso um anticorpo ou fragmento de anticorpo aqui, que produz 50 % de atividade de HGF de controle, isto é, EC_{50} . A EC_{50} pode ser determinada usando um ensaio de ligação de ligante como determinado por uma técnica imunológica padrão tal como ELISA, RIA ou por um ensaio baseado em célula tal como difração de célula, crescimento em ágar macio e/ou ensaio de invasão de matriz (ensaio de tubulomorfogênese). Preferivelmente a atividade inibidora EC_{50} é menor que 5 $\mu\text{g/ml}$, menor que 1 $\mu\text{g/ml}$, menor que 0,5 $\mu\text{g/ml}$, menor que 0,1 $\mu\text{g/ml}$, e até mesmo preferivelmente menor que 50 ng/ml , como medida, por exemplo, por ELISA. Antagonismo é a habilidade para impedir interação e inibir a ação do efector positivo de HGF ligando o receptor de c-Met, por exemplo, um c-Met humano carregado em uma célula de uma linhagem celular estabelecida em cultura, ou carregado em uma linhagem celular primária estabelecida de uma amostra de tecido humano, ou proteína de c-Met purificada que está comercialmente disponível (R&D Systems #358 MT) que é imobilizada em uma placa de ensaio ou em uma conta. Uma medida da atividade antagonística é a concentração do efector, neste caso um anticorpo ou fragmento de anticorpo aqui que inibe 50 % da atividade de HGF de controle, isto é, IC_{50} . A IC_{50} pode ser determinada usando um ensaio de ligação de ligante como determinado por uma técnica imunológica padrão tal como ELISA, RIA ou por um ensaio baseado em célula, tal como difração de célula, crescimento em ágar macio e/ou ensaio de invasão de matriz (ensaio de tubulomorfogênese). Preferivelmente a atividade inibidora de IC_{50} é menor que 5 $\mu\text{g/ml}$,

menor que 1 µg/ml, menor que 0,5 µg/ml, menor que 0,1 µg/ml, e até mesmo preferivelmente menor que 50 ng/ml, como medida, por exemplo, por ELISA.

ENSAIO DE MODULAÇÃO DE FOSFORILAÇÃO DE c-Met POR ANTICORPOS DE ANTI-c-Met AGONÍSTICOS OU ANTAGONÍSTICOS

- 5 Agonismo ou antagonismo por anticorpos de anti-c-Met da invenção é medido por ativação ou inibição de fosforilação de c-Met em células com e sem estimulação com HGF. Células de uma linhagem celular tais como células de A549 são colocadas em placa a uma densidade de 3×10^4 células por poço em um volume total de 100 µl/poço suplementado com
- 10 DMEM com 10 % FBS em placas de 96 poços de fundo chato tratadas com cultura de tecido (Costar, #3595). As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂ durante 24 h após as quais o meio é aspirado suavemente de cada poço das placas e um volume de 100 µl/poço DMEM adicionado. As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂
- 15 durante 24 h após as quais uma amostra de um anticorpo purificado a ser testado, 100 µl por poço do anticorpo ou uma diluição, é adicionado às células no poço diluído em DMEM. Como um controle negativo por falta de ativação, uma amostra de um anticorpo não relacionado (tendo uma especificidade conhecida não relacionado com os determinantes de epítipo de c-
- 20 Met), ou tampão, é adicionada aos poços designados.

- As células são incubadas a 37° C durante um período de tempo curto (por exemplo, 2 horas) ou um período de tempo mais longo (por exemplo, 24 horas). Onde apropriado, as células são estimuladas pela adição de HGF em meios de DMEM livres de soro a uma concentração final de 200
- 25 ng/poço. Em geral, quando ensaiar a atividade agonística dos anticorpos, com exceção do controle positivo (não tratado com anticorpo), HGF é omitido dos poços de anticorpo de amostra de teste. Em geral, quando ensaiar a atividade antagonística dos anticorpos, HGF é incluído nos poços de anticorpo de amostra de teste. Placas são também incubadas por 10 min a 37°
- 30 C, depois o meio é aspirado suavemente dos poços das placas. As células são lavadas com PBS frio e a solução é aspirada suavemente das placas. As células são lisadas com 50 µl de tampão de lise (NP-40 tampão de lise:

120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 % NP-40, 1 mM EDTA, 6 mM EG-
TA, 20 mM NaF, 1 mM Benzamidina com 0,5 mM Na₃VO₄ recentemente adi-
cionado, e 0,1 mM PMSF. As placas são agitadas em temperatura ambiente
durante 15 minutos, e são depois armazenadas a -80° C até precisadas para
5 ELISA.

Um ELISA é usado para determinar os níveis de fosforilação de
c-Met. Para preparação da placa de ELISA, placa Nunc-Imuno™, Maxi-
Sorb™ Surface (VWR AG Internacional, N°391-8786) é lavada duas vezes
com tampão de lavagem (PBS-0,05 % Tween Biorad #670-6531), e 100 µl
10 de c-Met anticorpo de captura monoclonal (DO-24) em PBS são adiciona-
dos. As placas são incubadas durante a noite a 4° C três vezes lavadas com
PBS-0,05 % Tween. Os sítios de ligação não-específicos são bloqueados
com 200 µl/poço 3 % BSA em PBS-T durante 2 horas em temperatura ambi-
ente, com agitação. Imediatamente antes do uso, a solução de bloqueio é
15 removida.

Lisados de célula congelados são fundidos agitando em tempe-
ratura ambiente e 40 µl de lisado são adicionados às placas de Nunc-Imuno
e as placas são incubadas a 4° C durante 4 horas. As placas são lavadas
três vezes com PBS-T, e 50 µl/poço de 0,2 µg/ml anticorpo anti-fosfotirosina
20 PY20-HRP (ZYMED, #03-7722) em 3 % albumina de soro bovino-PBS-T. As
placas são incubadas durante a noite a 4° C e lavadas três vezes com PBS-
T. O PBS-T é aspirado e 90 µl / poço substrato de fosfatase alcalina (CDR-
Star, TROPIX, #MS100RY) adicionados e desenvolvidos enquanto agitando
suavemente por 45 min em temperatura ambiente. As placas são lidas u-
25 sando uma leitora de placa de 96 poços.

Estes resultados demonstram que os membros da classe anta-
gonística de anticorpos de anti-c-Met inibem a habilidade de HGF para esti-
mular fosforilação de c-Met.

MODULAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO INDUZIDA POR HGF COM CLONES 30 AGONÍSTICOS E ANTAGONÍSTICOS DE ANTICORPOS DE ANTI-c-Met

Um ensaio é executado para medir o efeito antagonístico ou a-
gonístico de anticorpos de anti-c-Met, na ausência ou sob estimulação com

HGF. Células de uma linhagem celular, tal como 4MBr-5, são colocadas em placa a uma densidade de 3×10^3 células por poço em um volume total de 100 µl/poço suplementado com Ham's F12K com 10 % FBS em placas tratadas com cultura de tecido de fundo chato de 96 poços (Costar, #3610). As

5 placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂ por 2 h após as quais são adicionados 50 µl de meio contendo o anticorpo purificado a ser testado. Como um controle negativo por falta de modulação, uma amostra de um anticorpo não relacionado (tendo uma especificidade conhecida não relacionada com os determinantes de epítipo de c-Met), ou tampão, é adicionada aos poços designados. As placas são incubadas a 37° C em uma

10 atmosfera de 5 % CO₂ por 1 h após as quais, 50 µl do meio sozinho ou 50 µl contendo HGF (por exemplo, cerca de 0,5 µg/µl a cerca de 50 ng/ml) são adicionados. As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂ durante 72 h após as quais incorporação de BrDU é ensaiada usando a

15 ELISA de proliferação celular, ensaio de BrdU (Roche) No de Cat. 1 669 915. Brevemente, 20 µl/poço de solução de BrdU (#1) são adicionados e as placas incubadas durante 22 h a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂. Meio é suavemente removido e a placa secada durante 1 h a 60° C. 200 µl de FixDenat (solução #2) são adicionados e as placas incubadas em temperatura

20 ambiente com agitação suave durante 30 minutos. A solução é suavemente removida e 100 µl/poço solução de trabalho de anti-BrDU adicionados. As placas são incubadas em temperatura ambiente com agitação suave durante 90 minutos. A solução é suavemente removida e os poços lavados três vezes com 250 µl de solução de lavagem. A solução é suavemente re-

25 movida e 100 µl/poço solução de substrato adicionados, as placas são medidas a A405nm.

Estes resultados demonstram que proliferação estimulada por HGF das células expressando níveis de c-Met é inibida em células que foram tratadas com clones de anticorpo anti-c-Met antagonístico.

30 MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR c-Met-DEPENDENTE COM UMA CLASSE ANTAGONÍSTICA DE ANTICORPOS DE ANTI-c-Met

Células de certas linhagens celulares, tais como células de NCI-

H441 que expressam c-Met, são conhecidas migrar em resposta a um gradiente de concentração de HGF. Ensaios são executados usando células de NCI-H441 onde a habilidade dos anticorpos de anti-cMet para modular migração através de uma membrana perfurada (Ensaio de Câmara Boyden) de uma área de concentração de HGF baixa para uma área de concentração de HGF alta é medida.

Migração celular é ensaiada usando ensaio de migração celular de 96 poços de quimiotaxia de QCM™ 8 µM. Conseqüentemente, 24 h antes do ensaio, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e privadas no DMEM contendo 1 % FBS a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂. Subseqüentemente, as células são tripsinadas e re-suspensas em 1,0 x 10⁶ células por ml na presença de concentração apropriada do anticorpo purificado por 30min a 37° C. Como um controle negativo por falta de modulação, uma amostra de um anticorpo não relacionado (tendo uma especificidade conhecida não relacionada aos determinantes de epítipo de c-Met), ou tampão, é adicionada aos poços designados.

Sob condições estéreis a tampa da placa de câmara de migração é removida e 150 µl de soro meios livres contendo 50 ng/ml HGF (R&D No de Cat. 294-HGN) são adicionados aos poços da bandeja alimentadora (câmara inferior). 100 µl de 5-10 x 10⁴ células em DMEM com 1 % FBS pré-incubado com anticorpo são adicionados suavemente à câmara superior. A placa é coberta e incubada durante 16 horas a 37° C entre 4-6 % CO₂. Seguindo as instruções dos fabricantes, as células/meios na câmara superior são descartados e a câmara colocada em uma Bandeja Alimentadora de 96 poços à qual 150 µL/poço solução de separação de célula pré-aquecida foram adicionados. Células são desalojadas incubando durante 30 minutos a 37° C com agitação suave periódica. Subseqüentemente, 50 µl de tintura de CyQuant GR pré-diluída são adicionados a cada poço da bandeja alimentadora. A placa é incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente e 150 µl da mistura transferidos para uma placa de 96 poços nova adequada para medição de fluorescência usando um conjunto de filtro de 480/520 nm.

Dados obtidos mostram que uma classe do clones de anticorpo

antagonístico de anti-c-Met são capazes de inibir uma consequência biológica de ativação de c-Met, a saber, migração de células NCI-H441 estimulada por HGF através de uma membrana microporosa.

DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE AFINIDADE K_D DE ANTICOR-

5 POS DE ANTI-c-Met POR BIACORE™

A afinidade de ligação de anticorpo purificado é determinada usando ressonância de plasmon de superfície usando o instrumento BIACORE™ 3000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, N.J.), seguindo os protocolos do fabricante, como descritos acima para anticorpos antagonísticos.

DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES DE AFINIDADE (K_D) DE ANTICOR-

POS DE ANTI-c-Met COM CITOMETRIA DE FLUXO

A afinidade de ligação de anticorpos purificados para c-Met expressos na superfície de células de carcinoma pulmonar humano A549 e células pulmonares cinomólogas é determinada através de citometria de fluxo usando o citômetro de fluxo de BD™ Biosciences LSR de acordo com os protocolos do fabricante, como descritos acima para anticorpos antagonísticos.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais, ou porção(ões) de ligação de antígeno dos mesmos, da presente invenção, formulada juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável. Tais composições podem incluir um ou uma combinação de (por exemplo, dois ou mais diferentes) anticorpos, ou imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de anticorpos (ou imunoconjugados ou biespecíficos) que ligam a epítopos diferentes no antígeno alvo ou que têm atividades complementares.

Composições farmacêuticas da invenção podem também ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um anticorpo de

anti-c-Met da presente invenção combinado com pelo menos um outro agente anticâncer ou antiinflamatório. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados em terapia de combinação são descritos em maior detalhe abaixo na seção em usos dos anticorpos da invenção.

5 Como aqui usado, "o veículo farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes de absorção, e outros que sejam fisiologicamente compatíveis. O veículo deveria ser adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, pa-
10 renteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da rota de administração, o composto ativo, isto é, anticorpo, imunoconjugado, ou molécula biespecífica, podem ser revestidos em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que possam inativar o composto.

15 Os compostos farmacêuticos da invenção podem incluir um ou mais sais farmaceuticamente aceitáveis. Um "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal que não afeta a atividade biológica desejada do composto de origem e não dá efeito toxicológico indesejado (vide por exemplo, Berge, S. M., et al., 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19). Exemplos de tais sais in-
20 cluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não-tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, hidrobromico, hidroiódico, fosforoso e outros, como também de ácidos orgânicos não-tóxicos tais como ácidos mono e di-carboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenil-substituídos, ácidos
25 hidróxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e outros. Sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalinos terrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e outros, como também de aminas orgânicas não-tóxicas, tais como N,N'-dibenziletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolami-
30 na, etilenodiamina, procaína e outros.

Uma composição farmacêutica da invenção também pode incluir um antioxidante farmaceuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes

farmaceuticamente aceitáveis incluem pelo menos: antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e outros; antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol, e outros; e agentes quelantes de metal, tais como ácido cítrico, ácido tetraacético de etilenodiamina (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e outros.

Exemplos de veículos aquosos e não-aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem em água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e outros), e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tais como azeite de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila. Fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

Estas composições podem também conter adjuvantes tais como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. Prevenção de presença de microorganismos pode ser assegurada por procedimentos de esterilização, supra, e pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol, e outros. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e outros nas composições. Além disso, absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela inclusão de agentes tais como os que tardam a absorção, monoestearato de alumínio e gelatina.

Veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersão injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto desde que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, uso do mesmo nas composições farmacêuticas da invenção é contemplado. Compostos ativos adicionais podem também ser incorpora-

dos nas composições.

Composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para concentração alta de fármaco. O veículo
5 pode ser um solvente ou dispersão contendo meio, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e outros), e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela
10 manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, pode-se incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. Absorção prolongada das composições injetáveis pode
15 ser provocada incluindo na composição um agente que tarda a absorção por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido por microfiltração de esterilização. Em geral, as dispersões são
20 preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril contendo um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação são secagem a vácuo e secagem por refrigeração (liofilização) que rende um pó do ingrediente ativo mais
25 qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução previamente filtrada estéril do mesmo.

A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinado com um material de veículo para produzir uma forma de dosagem simples variará, dependendo do sujeito sendo tratado, e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinado com um
30 material de veículo para produzir uma forma de dosagem simples em geral será aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico.

Em geral, fora de cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de ingrediente ativo, de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, ou de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável.

Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolo simples pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o passar do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma de unidade de dosagem como aqui usada refere-se às unidades fisicamente distintas adaptadas como dosagens unitárias para os sujeitos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as formas de unidade de dosagem da invenção é ditada e diretamente dependente das características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico particular a ser alcançado, e as limitações inerentes na técnica de composição de um tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Para administração do anticorpo, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg, e mais usualmente 0,01 a 5 mg/kg, do peso do corpo do hospedeiro. Por exemplo dosagens podem ser 0,3 mg/kg peso do corpo, 1 mg/kg peso do corpo, 3 mg/kg peso do corpo, 5 mg/kg peso do corpo ou 10 mg/kg peso do corpo ou dentro da faixa de 1-10 mg/kg. Um regime de tratamento exemplar requer administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada 3 meses ou uma vez a cada três a 6 meses. Regimes de dosagem para um anticorpo de anti-c-Met da invenção incluem 1 mg/kg peso do corpo ou 3 mg/kg peso do corpo por ad-

ministração intravenosa, com o anticorpo sendo dado usando um dos programas de doseamento a seguir: cada quatro semanas para seis dosagens, depois a cada três meses; cada três semanas; 3 mg/kg peso do corpo uma vez seguido por 1 mg/kg peso do corpo a cada três semanas.

5 Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos com as mesmas especificidades de ligação ou diferentes são administrados simultaneamente em cujo caso a dosagem de cada anticorpo administrado enquadra-se nas faixas indicadas. Anticorpo é usualmente administrado em ocasiões múltiplas. Intervalos entre as dosagens simples podem ser, por exemplo, semanalmente, mensal, a cada três meses ou anualmente. Intervalos podem também ser irregulares como indicado medindo níveis de sangue de anticorpo para o antígeno alvo no paciente. Em alguns métodos, dosagem é ajustada para alcançar uma concentração de anticorpo no plasma de cerca de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos cerca de 25-300 µg/ml.

15 Alternativamente, anticorpo pode ser administrado como uma formulação de liberação contínua em cujo caso administração menos frequente é requerida. Dosagem e frequência variam, dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente. Em geral, anticorpos humanos mostram a meia-vida mais longa, seguidos por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, e anticorpos não-humanos. A dosagem e frequência de administração podem variar, dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente infreqüentes em um período longo de tempo. Alguns pacientes continuam recebendo tratamento para o resto de sua vida. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é às vezes requerida até progressão da doença ser reduzida ou terminada ou até que o paciente mostre melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Depois disso, o paciente pode ser administrado com um regime profilático.

30 Níveis de dosagem atuais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados para obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para alcançar a resposta

terapêutica desejada para um paciente particular, composição, e modo de administração, sem ser tóxico ao paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregadas, ou
5 do éster, sal ou amida destes, da rota de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do ser composto particular empregado, da duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, da idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente
10 sendo tratado, e como também de fatores conhecidos nas técnicas médicas.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo de anti-c-Met da invenção resulta em uma diminuição na severidade dos sintomas da doença, um aumento na frequência e duração de períodos sem sintomas da doença, ou uma prevenção de diminuição da capacidade ou inap-
15 tidão devido à aflição da doença. Sintomas da doença incluem critérios diagnósticos padrões de câncer, tais como estágio, tamanho de tumor primário, membro e tamanho de metástase, ou extensão da inflamação.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma ou mais rotas de administração usando um ou mais de uma variedade de métodos conhecido na técnica. Como será apreciado pelo artesão
20 versado, a rota e/ou modo de administração variará, dependendo dos resultados desejados. Rotas de administração para anticorpos da invenção incluem rotas de administração intravenosas, intramusculares, intradérmicas, intraperitoneais, parenterais, subcutâneas, espinhais ou outras, por exemplo
25 por injeção ou infusão. A frase "administração parenteral" como aqui usada significa modos de administração diferentes de administração enteral e tópica, usualmente através de injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueana, subcutânea, sub-
30 cuticular, intra-articular, subcapsular, subaraquinóide, intraespinhal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, um anticorpo da invenção pode ser adminis-

trado por uma rota não-parenteral, tal como uma rota de administração tópica, epidérmica ou mucosa, por exemplo, intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou topicamente.

Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que protegerão o composto contra liberação rápida, tais como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulados. Podem ser usados polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, tais como acetato de vinila de etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou em geral conhecidos àqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tal como os dispositivos mostrados nas patentes U. S. Nos. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 ou 4.596.556. Exemplos de implantes bem conhecidos e módulos úteis na presente invenção incluem pelo menos: patente U. S. No. 4.487.603 que mostra uma bomba de micro-infusão implantável para dispensar medicação em uma taxa controlada; patente U. S. No. 4.486.194 que mostram um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; patente U. S. No. 4.447.233 que mostram uma bomba de infusão de medicação para liberar medicação em uma taxa de infusão precisa; patente U. S. No. 4.447.224 que mostram um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para liberação contínua de fármaco; patente U. S. No. 4.439.196 que mostram um sistema de liberação de fármaco osmótico tendo compartimentos de multicâmaras; e patente U. S. No. 4.475.196 que mostra um sistema de liberação de fármaco osmótico. Estas patentes são incorporadas aqui por referência. Muitos outros tais implantes, sistemas de liberação, e módulos são conhecidos àqueles versados na técnica.

nica.

Em certas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser formulados para assegurar distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrófi-

5 los. Para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção cruzem a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabricação de lipossomas, vide, por exemplo, Patentes U. S.s 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais metades que são seletivamente transportadas em

10 células ou órgãos específicos, desse modo para intensificar a liberação de fármaco alvejada (vide, por exemplo, V. V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685). Metades alvo exemplares incluem folato ou biotina (vide, por exemplo, Patente U. S. 5.416.016 para Low et al.); manosídeos (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticorpos (P.G.

15 Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A de tensoativo (Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); vide também K. Keinänen; M. L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J. J. Killian; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

20 AS COMBINAÇÕES

A invenção também refere-se a um método de impedir ou tratar doenças proliferativas ou doenças, tais como um câncer, em um mamífero, particularmente um humano, com uma combinação de agentes farmacêuticos que compreendem.

- 25 (a) uma composição de antagonista de anticorpo de c-Met; e
(b) um ou mais agentes farmacêuticamente ativos.

A invenção também refere-se às composições farmacêuticas compreendendo:

- (a) uma composição de antagonista de anticorpo de c-Met;
30 (b) um agente farmacêuticamente ativo; e
(c) um veículo farmacêuticamente aceitável.

A presente invenção também refere-se a um pacote ou produto

comercial compreendendo:

(a) uma formulação farmacêutica de uma composição de antagonista de anticorpo de c-Met; e

(b) uma formulação farmacêutica de um agente farmacêuticamente ativo para uso simultâneo, concorrente, separado ou seqüencial.

OS AGENTES FARMACEUTICAMENTE ATIVOS

O termo "agentes farmacêuticamente ativos" é vasto abrangendo muitos agentes farmacêuticamente ativos que têm mecanismos diferentes de ação. Combinações de alguns destes com anticorpos/composições de antagonista de c-Met podem resultar em melhorias na terapia de câncer. Em geral, agentes farmacêuticamente ativos são classificados de acordo com o mecanismo de ação. Muitos dos agentes disponíveis são anti-metabólitos das vias de desenvolvimento de vários tumores, ou reagem com o DNA das células tumorais. Há também agentes que inibem enzimas, tais como topoisomerase I e topoisomerase II, ou que são agentes anti-mitóticos.

Pelo termo "agente farmacêuticamente ativo" é especialmente significado qualquer agente farmacêuticamente ativo diferente de uma composição de antagonista de anticorpo c-Met ou um derivado do mesmo. Inclui, mas não é limitado a:

- i. um inibidor de aromatase;
- ii. um anti-estrogênio, um anti-andrógeno ou um agonista de gonadorrelina;
- iii. um inibidor de topoisomerase I ou um inibidor de topoisomerase II;
- iv. um agente ativo de microtúbulo, um agente de alquilação, um anti-metabólito antineoplástico ou um composto de platina;
- v. um composto de alvejar/diminuir uma atividade de proteína ou de lipídio cinase ou uma atividade de proteína ou de lipídio fosfatase, um composto anti-angiogênico também ou um composto que induz processos de diferenciação de célula;
- vi. anticorpos monoclonais;
- vii. um inibidor de ciclooxigenase, um bisfosfonato, um ini-

bidor de heparanase, um modificador de resposta biológica;

viii. um inibidor de isoformas oncogênicas de Ras;

ix. um inibidor de telomerase;

x. um inibidor de protease, um inibidor de metaloproteína-
5 se de matriz, um inibidor de aminopeptidase de metionina, ou um inibidor de proteassoma;

xi. agentes usados no tratamento de malignidades hema-
tológicas ou compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de Flt-
3;

10 xii. um inibidor de HSP90;

xiii. anticorpos antiproliferativos;

xiv. um inibidor histona desacetilase (HDAC);

xv. um composto que alveja, diminui ou inibe a ativida-
de/função de serina/treonina mTOR cinase;

15 xvi. antagonista de receptor de somatostatina;

xvii. um composto anti-leucêmico;

xviii. métodos danificadores de célula tumoral;

xix. um aglutinante de EDG;

xx. um inibidor de ribonucleotídeo reductase;

20 xxi. um inibidor S-adenosilmetionina descarboxilase;

xxii. um anticorpo monoclonal de VEGF ou VEGFR;

xxiii. terapia fotodinâmica;

xxiv. um esteróide angiostático;

xxv. um implante contendo corticosteróides;

25 xxvi. antagonista de receptor de AT1; e

xxvii. um inibidor de ACE.

O termo "inibidor de aromatase", como aqui usado, refere-se a um composto que inibe a produção de estrogênio, isto é, a conversão dos substratos androstenediona e testosterona para estrona e estradiol, respec-
30 tivamente. O termo inclui, mas não é limitado a, esteróides, especialmente atamestano, exemestano e formestano; e, em particular, não-esteróides, especialmente aminoglutetimida, rogletimida, piridoglutetimida, trilostano,

testolactona, cetoconazol, vorozol, fadrozol, anastrozol e letrozol. Exemestano é comercializado como AROMASIN; formestano como LENTARON; fadrozol como AFEMA; anastrozol como ARIMIDEX; letrozol como FEMARA ou FEMAR; e aminoglutetimida como ORIMETEN. Uma combinação da invenção compreendendo um agente farmacologicamente ativo que é um inibidor de aromatase é particularmente útil para o tratamento de tumores positivos de receptor de hormônio, por exemplo, tumores de mama.

O termo "anti-estrogênio", como aqui usado, refere-se a um composto que antagoniza o efeito dos estrogênios no nível de receptor de estrogênio. O termo inclui, mas não é limitado a, tamoxifeno, fulvestrant, raloxifeno e cloridrato de raloxifeno. Tamoxifeno pode ser administrado na forma como é comercializado, por exemplo, NOLVADEX; e cloridrato de raloxifeno é comercializado como EVISTA. Fulvestrant pode ser formulado como revelado na patente U. S. No. 4.659.516 e é comercializado como FASLODEX. Uma combinação da invenção compreendendo um agente farmacologicamente ativo que é um anti-estrogênio é particularmente útil para o tratamento de tumores positivos de receptor de estrogênio, por exemplo, tumores de mama.

O termo "anti-andrógeno", como aqui usado, refere-se a qualquer substância que é capaz de inibir os efeitos biológicos de hormônios androgênicos e inclui, mas não é limitado a, bicalutamida (CASODEX) que pode ser formulada por exemplo, como revelado na patente U. S. No. 4.636.505.

O termo "agonista de gonadotrelina", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, abarelix, goserrelina e acetato de goserrelina. Goserrelina é revelada na patente U. S. No. 4.100.274 e é comercializado como ZOLADEX. Abarelix pode ser formulado, por exemplo, como revelado na patente U. S. No. 5.843.901.

O termo "inibidor de topoisomerase I", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, topotecan, gimatecan, irinotecan, camptotecina e seus análogos, 9-nitrocampotecina e o conjugado de camptotecina macromolecular PNU-166148 (composto A1 em WO 99/17804). Irinotecan pode ser admi-

nistrado, por exemplo, na forma como é comercializado, por exemplo, sob a marca registrada CAMPTOSAR. Topotecan pode ser administrado, por exemplo, na forma como é comercializado, por exemplo, sob a marca registrada HYCAMTIN.

5 O termo "inibidor de topoisomerase II", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, as antraciclinas, tais como doxorubicina, incluindo
 10 formulação lipossomal, por exemplo, CAELYX, daunorrubicina, incluindo formulação lipossomal, por exemplo, DAUNOSOME, epirubicina, idarrubicina e nemorrubicina; as antraquinonas mitoxantrona e losoxantrona; e as podofilotoxinas etoposida e teniposida. Etoposida é comercializado como E-
 TOPOPHOS; teniposida como VM 26-BRISTOL; doxorubicina como ADRI-
 BLASTIN ou ADRIAMYCIN; epirubicina como FARMORUBICIN; idarrubicina como ZAVEDOS; e mitoxantrona como NOVANTRON.

O termo "agente ativo de microtúbulo" como aqui usado, refere-
 15 se a agentes de estabilização de microtúbulo, desestabilização de microtúbulo e inibidores de polimerização de microtubulina incluindo, mas não limitados a, taxanos, por exemplo, paclitaxel e docetaxel; alcalóides de vinca, por exemplo, vinblastina, especialmente sulfato de vinblastina; vincristina, especialmente sulfato de vincristina e vinorelbina; discodermolidas; coquicina e
 20 epotilonas e derivados dos mesmos, por exemplo, epotilona B ou um derivado do mesmo. Paclitaxel é comercializado como TAXOL; docetaxel como TAXOTERE; sulfato de vinblastina como VINBLASTIN R.P; e sulfato de vincristina como FARMISTIN. Também incluso são as formas genéricas de paclitaxel como também várias formas de dosagem de paclitaxel. Formas ge-
 25 néricas de paclitaxel incluem, mas não são limitadas a, cloridrato de betaxolol. Várias formas de dosagem de paclitaxel incluem, mas não são limitadas a, paclitaxel de nanopartícula de albumina comercializado como ABRAXANE; ONXOL, CYTOTAX Discodermolida pode ser obtida, por exemplo, como revelado na patente U. S. No. 5.010.099. Também incluso são derivados de
 30 Epotolina que são revelados na patente U. S. No. 6.194.181, WO 98/10121, WO 98/25929, WO 98/08849, WO 99/43653, WO 98/22461 e WO 00/31247. Especialmente preferido é Epotolina A e/ou B.

O termo "agente de alquilação", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan ou nitrosouréia (BCNU ou Gliadel), ou temozolamida (TEMODAR). Ciclofosfamida pode ser administrada, por exemplo, na forma como é comercializada, por exemplo, sob a
5 marca registrada CYCLOSTIN; e ifosfamida como HOLOXAN.

O termo "anti-metabólito anti-neoplástico" inclui, mas não é limitado a, 5-fluorouracil (5-FU); capecitabina; gencitabina; agentes de desmetilação de DNA, tais como 5-azacitidina e decitabina; metotrexato; edatrexato; e antagonistas de ácido fólico tais como, mas não limitado a, pemetrexed.
10 Capecitabina pode ser administrada, por exemplo, na forma como é comercializado, por exemplo, sob a marca registrada XELODA; e gencitabina como GEMZAR.

O termo "composto de platina", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, carboplatina, cis-platina, cisplatina, oxaliplatina, Satraplatina e
15 agentes de platina tais como ZD0473. Carboplatina pode ser administrada, por exemplo, na forma como é comercializado, por exemplo, CARBOPLAT; e oxaliplatina como ELOXATIN.

O termo "compostos de alvejar/diminuir uma proteína ou atividade de de lipídio cinase; ou uma proteína ou atividade de lipídio fosfatase; ou
20 outros compostos anti-angiogênicos", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, inibidores de proteína tirosina e/ou serina cinase e/ou treonina cinase ou inibidores de lipídio cinase, por exemplo:

i) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade dos receptores de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), tais como
25 compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de VEGF, especialmente compostos que inibem o receptor de VEGF, tais como, mas não limitados a, derivados de 7H-pirrólo[2,3-d]pirimidina (AEE788); BAY 43-9006; compostos de isolcolina revelados em WO 00/09495 tais como (4-terc-butilfenil)-94-piridin-4-ilmetil-isoquinolin-1-il)-amina (AAL881); e

30 ii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade dos receptores de fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGFR), tais como compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de PDG-

FR, especialmente compostos que inibem o receptor de PDGF, por exemplo, um derivado de N-fenil-2-pirimidina-amina, por exemplo, imatinib, SU101, SU6668 e GFB-111;

5 iii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade dos receptores de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR);

 iv) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade do receptor de fator de crescimento insulino-símile 1 (IGF-1R), tais como compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de IGF-1R, especialmente compostos que inibem o receptor de IGF-1R. Compostos incluem
10 mas não são limitados aos compostos revelados em WO 02/092599 e derivados dos mesmos de derivados de 4-amino-5-fenil-7-ciclobutil-pirrólo[2,3-d]pirimidina (AEW541);

 v) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade da família de tirosina cinase de receptor Trk;

15 vi) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade da família de tirosina cinase de receptor Axl;

 vii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade do receptor de c-Met;

 viii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade
20 da tirosina cinase de receptor Ret;

 ix) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade da tirosina cinase de receptor Kit/SCFR;

 x) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade das tirosina cinases de receptor C-kit (parte da família de PDGFR), tais como compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade da família de
25 tirosina cinase de receptor c-kit, especialmente compostos que inibem o receptor de c-kit, por exemplo, imatinib;

 xi) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade dos membros da família c de Abl e seus produtos de fusão gênica, por exemplo, BCR-Abl Cinase, tal como compostos que alvejam, diminuem ou
30 inibem a atividade dos membros da família c-Abl e seus produtos de fusão gênica, por exemplo, um derivado de N-fenil-2-pirimidina-amina, por exem-

plo, imatinib, PD180970, AG957, NSC 680410 ou PD173955 de ParkeDavis; BMS354825

xii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de membros da família de proteína cinase C (PKC) e de Raf das serina/treonina cinases, membros da família de MEK, SRC, JAK, FAK, PDK e Ras/MAPK, ou família de PI(3) cinase, ou da família de cinase relacionada à PI(3) cinase, e/ou os membros da família de cinase ciclina-dependente (CDK) e são especialmente aqueles derivados de estaurosporina revelados na patente U. S. No. 5.093.330, por exemplo, midostaurina; exemplos de outros compostos incluem, por exemplo, UCN-01; safingol; BAY 43-9006; Briostatina 1; Perifosina; Ilmofosina; RO 318220 e RO 320432; GO 6976; Isis 3521; LY333531/LY379196; compostos de isoquinolina, tais como aqueles revelados em WO 00/09495; FTIs; PD184352 ou QAN697, um inibidor de P13K;

xiii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de proteína-tirosina cinase, tais como mesilato de imatinib (GLEEVEC); tirfostina ou pirimidilaminobenzamida e derivados dos mesmos (AMN107). Uma tirfostina é preferivelmente um composto de peso molecular baixo ($M_r < 1500$), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, especialmente um composto selecionado da classe de benzilidenomalonitrila ou S arilbenzenomalonitrila ou a classe de compostos de quinolina de bi-substrato, mais especialmente qualquer composto selecionado do grupo que consiste em Tyrphostin A23/RG-50810, AG 99, Tyrphostin AG 213, Tyrphostin AG 1748, Tyrphostin AG 490, Tyrphostin B44, enantiômero de Tyrphostin B44 (+), Tyrphostin AG 555, AG 494, Tyrphostin AG 556; AG957 e adaphostin (éster de adamantila de ácido 4-[(2,5-diidroxifenil)metil]amino}-benzóico, NSC 680410, adaphostin);

xiv) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade da família de fator de crescimento epidérmico de tirosina cinases de receptor (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 como homo ou heterodímeros), tais como compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade da família de fator de crescimento de receptor epidérmico são especialmente compostos, prote-

inas ou anticorpos que inibem os membros da família de tirosina cinase de receptor EGF, por exemplo, receptor de EGF, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 ou liga a EGF ou ligantes relacionados a EGF, e são em particular aqueles compostos, proteínas ou anticorpos monoclonais genérica e especificamente revelados em WO 97/02266, por exemplo, o composto do Exemplo 39, ou na EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0520722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, patente U. S. No. 5.747.498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 e, especialmente, WO 96/30347, por exemplo, composto conhecido como CP 358774, WO 96/33980, por exemplo, composto ZD 1839; e WO 95/03283, por exemplo, composto ZM105180, por exemplo, trastuzumab (HERCEPTIN®), cetuximab, Iressa, OSI-774, CI 1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 ou E7.6.3, e derivados de 7H-pirrólo-[2,3-d]pirimidina que são revelados em WO 03/013541, erlotinib e gefitinib. Erlotinib pode ser administrado na forma como é comercializado, por exemplo TARCEVA, e gefitinib como IRESSA, anticorpos monoclonais humanos contra o receptor de fator de crescimento epidérmico incluindo ABX-EGFR; e

xv) Compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade/função de mTOR serina/treonina cinase são especialmente compostos, proteínas ou anticorpos que alvejam/inibem os membros da família de mTOR cinase, por exemplo, RAD, RAD001, CCI-779, ABT578, SAR543, rapamicina e derivados/análogos dos mesmos; AP23573 e AP23841 de Ariad, everolimus (CERTICAN) e sirolimus. CERTICAN (everolimus, RAD) um inibidor de sinal de proliferação investigatório novo que impede a proliferação de células T e células vasculares de músculo liso.

Quando referir a anticorpo, é para incluir anticorpos monoclonais intactos, nanocorpos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos formados de pelo menos 2 anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpos desde que eles exibam a atividade biológica desejada.

A frase "composto que alveja, diminui ou inibe a atividade de uma proteína ou lipídio fosfatase" como aqui usada inclui mas não é limitada a inibidores de fosfatase 1, fosfatase 2A, PTEN ou CDC25, por exemplo,

ácido ocadáico ou um derivado do mesmo.

O termo "anticorpos monoclonais", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a bevacizumab, cetuximab, trastuzumab, lbritumomab tiuxetan, denosumab, anti-CD40, anti-GM-CSF, e tositumomab e iodo I¹³¹. Bevacizumab pode ser administrado na forma como é comercializado, por exemplo AVASTIN; cetuximab como ERBITUX; trastuzumab como HERCEPTIN; Rituximab como MABTHERA; lbritumomab tiuxetan como ZEVULIN; anti-RANKL como denosumab (AMG 162), anti-CD40 como HCD122 (pedido de patente U. S. 2002-0106371), e tositumomab e iodo I¹³¹ como BEXXAR.

10 A frase "outros compostos anti-angiogênicos" inclui mas não é limitada a compostos tendo outro mecanismo para sua atividade, por exemplo, não relacionados à inibição de proteína ou lipídio cinase, por exemplo, talidomida (THALOMID) e TNP-470.

15 A frase "compostos que induzem processos de diferenciação de célula" como aqui usada, inclui mas não é limitada a ácido retinóico, α , γ ou δ -tocofherol ou α , γ ou δ -tocotrienol.

20 O termo "inibidor de ciclooxygenase" como aqui usado inclui, mas não é limitado a, por exemplo, Inibidores de Cox-2, ácido 5-alquil 2-arilaminofenilacético substituído e derivados, tais como celecoxib (CELEBREX), rofecoxib (VIOXX), etoricoxib, valdecoxib ou um ácido 5-alquil-2-arilaminofenilacético, por exemplo, ácido 5-metil-2-(2'-cloro-6'-fluoroanilino)fenil acético, lumiracoxib.

25 O termo "bisfosfonatos", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, ácido etridônico, clodrônico, tiludrônico, pamidrônico, alendrônico, ibandrônico, risedrônico e zoledrônico. "Ácido etridônico" pode ser administrado, por exemplo, na forma como é comercializado, por exemplo, DIDRONEL; "ácido clodrônico" como BONEFOS; "ácido tiludrônico" como SKELID; "ácido pamidrônico" como AREDIA; "ácido alendrônico" como FOSAMAX; "ácido ibandrônico" como BONDRANAT; "ácido risedrônico" como ACTONEL; e "ácido zoledrônico" como ZOMETA.

O termo "inibidor de heparanase", como aqui usado, refere-se aos compostos que alvejam, diminuem ou inibem degradação de sulfato de

heparina. O termo inclui, mas não é limitado a, PI 88.

O termo "modificador de resposta biológica", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a linfocina ou interferonas, por exemplo, interferona γ .

5 O termo "inibidor de isoformas oncogênicas de Ras", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a H-Ras, K-Ras ou N-Ras, como aqui usado, refere-se aos compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade oncogênica de Ras, por exemplo, um inibidor de farnesil transferase (FTI), por exemplo, L-744832, DK8G557 ou R115777 (ZARNESTRA).

10 O termo "inibidor de telomerase", como aqui usado, inclui, mas não é limitado aos compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de telomerase. Compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de telomerase são especialmente compostos que inibem o receptor de telomerase, por exemplo, telomestatina.

15 O termo "inibidor de metaloproteinase de matriz" ou (inibidor de MMP), como aqui usado, inclui, mas não é limitado, inibidores peptidomimético e não-peptidomiméticos de colágeno; derivados de tetraciclina, por exemplo, inibidor peptidomimético de hidroxamato batimastat; e seu análogo oralmente biodisponível marimastat (BB-2516), prinomastat (AG3340), metastat (NSC 683551) BMS 279251, LADRE 12-9566, TAA211, MMI270B ou AAJ996.

25 O termo "inibidor de aminopeptidase de metionina", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de aminopeptidase de metionina. Compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de aminopeptidase de metionina são, por exemplo, bengamida ou um derivado do mesmo.

O termo "inibidores de proteossoma", como aqui usado, inclui compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade do proteossoma. Compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade do proteossoma
30 incluem, mas não são limitados a, PS-341; MLN 341. bortezomib ou Velcade.

A frase "agente usado no tratamento de malignidades hematoló-

gicas", como aqui usada, inclui, mas não é limitada a, inibidores de tirosina cinase FMS-símile, por exemplo, compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de receptores de tirosina cinase FMS-símile (Flt-3R); interferona, 1-b-D-arabinofuransilcitosina (ara-c) e bissulfano; e inibidores de ALK, por exemplo, compostos que alvejam, diminuem ou inibem cinase de linfoma anaplástico.

A frase "compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de Flt-3" como aqui usada, inclui, mas não é limitada a compostos, proteínas ou anticorpos que inibem Flt-3, por exemplo, N-benzoil-estaurosporina, midostaurina, um derivado de estaurosporina, SU11248 e MLN518.

O termo "inibidores de HSP90", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de ATPase intrínseca de HSP90; degradando, alvejando, diminuindo ou inibindo as proteínas clientes de HSP90 por meio da via de proteossoma de ubiquitina. Compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de ATPase intrínseca de HSP90 são especialmente compostos, proteínas ou anticorpos que inibem a atividade de ATPase de HSP90, por exemplo, 17-alilamino, 17-demetoxigeldanamicina (17AAG), um derivado de geldanamicina; outros compostos geldanamicina-relacionados; radicicol e inibidores de HDAC.

O termo "um anticorpo antiproliferativo" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a trastuzumab (HERCEPTIN), trastuzumab-DM1, erlotinib (TARCEVA), bevacizumab (AVASTIN), rituximab (RITUXAN), PRO64553 (anti-CD40) e Anticorpo 2C4. Por anticorpos é significado por exemplo anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos formados de pelo menos 2 anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpos desde que exibam a atividade biológica desejada.

O termo "inibidor de HDAC", como aqui usado refere-se a compostos que inibem a histona desacetilase e que possuem atividade antiproliferativa. Estes incluem mas não são limitados a compostos revelados em WO 02/22577, especialmente N-hidróxi-3-[4-[[[(2-hidroxietil)]2-(1H-indol-3-il)etil]-amino]metil]fenil]-2E-2-propenamida, e N-hidróxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2E-2-propenamida e sais farmaceutica-

mente aceitáveis dos mesmos (LBH589). Isto também especialmente inclui ácido suberoilanolida hidroxâmico (SAHA); éster de piridino-3-ilmetila de ácido [4-(2-amino-fenilcarbamoil)-benzil]-carbâmico e derivados dos mesmos; ácido butírico, piroxamida, tricostatina A, Oxamflatina, apicidina, Depsipeptídeo; depudecina e trapoxina.

A frase "composto que alveja, diminui ou inibe a atividade/função de mTOR serina/treonina cinase" como aqui usada, inclui mas não é limitada a compostos, proteínas ou anticorpos que alvejam/inibem os membros da família de mTOR cinase, por exemplo, RAD, RAD001, CCI-779, ABT578, SAR543, rapamicina e derivados/análogos dos mesmos, AP23573 e AP23841 de Ariad, everolimus (CERTICAN) e sirolimus (RAPAMUNE), CCI-779 e ABT578. CERTICAN (everolimus, RAD) um inibidor de sinal de proliferação investigatório novo que impede proliferação de células T e células vasculares de músculo liso.

O termo "antagonista de receptor de somatostatina", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, agentes que alvejam, tratam ou inibem o receptor de somatostatina, tal como octreorida e SOM230.

O termo "composto anti-leucêmico" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a Ara-C, um análogo de pirimidina que é o derivado de 2'-α-hidróxi ribose (arabinosida) de deoxicitidina. Também incluso é o análogo de purina de hipoxantina, 6-mercaptopurina (6-MP) e fosfato de fludarabina.

A frase "métodos danificadores de célula tumoral" refere-se a métodos, tais como radiação de ionização. O termo "radiação de ionização", referido acima e doravante, significa que radiação de ionização que ocorre ou raios eletromagnéticos, tais como Raios X e raios gama; ou partículas, tais como partículas alfa, beta e gama. Radiação ionizante é fornecida, mas não limitada a, em terapia de radiação e é conhecida na técnica. Vide Hellman, Cancer, 4ª Edição, Vol. 1, Devita et al., Eds., págs. 248-275 (1993).

O termo "aglutinante de EDG" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, uma classe de imunossuppressores que modula recirculação de linfócitos, tais como FTY720.

O termo "inibidor de ribonucleotídeo reductase" como aqui usa-

do, inclui, mas não é limitado a, pirimidina ou análogos de nucleosídeo de purina incluindo, mas não limitado a, fludarabina e/ou ara-C; 6-tioguanina; 5-FU; cladribina; 6-mercaptopurina, especialmente em combinação com ara-C contra ALL; e/ou pentostatina. Inibidores de ribonucleotídeo reductase são especialmente hidroxiuréia ou derivados de 2-hidróxi-1H-isoindol-1,3-diona, tais como PL-1, PL-2, PL-3, PL-4, PL-5, PL-6, PL-7 ou PL 8. Vide Nandy et al., Acta Oncologica, Vol. 33, No. 8, págs. 953-961 (1994).

O termo "inibidores de S-adenosilmetionina descarboxilase", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, os compostos revelados na patente U. S. No. 5.461.076.

A frase "anticorpos monoclonais de VEGF ou VEGFR", como aqui usado, inclui mas não é limitado a, compostos revelados em WO 98/35958, por exemplo, 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)ftalazina ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, por exemplo, o succinato, ou em WO 00/09495, WO 00/27820, WO 00/59509, WO 98/11223, WO 00/27819 e EP 0 769 947; aqueles como descrito por Prewett et al., Cancer Res, Vol. 59, págs. 5209-5218 (1999); Yuan et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 93, págs. 14765-14770 (1996); Zhu et al., Cancer Res, Vol. 58, págs. 3209-3214 (1998); e Mordenti et al., Toxicol Pathol, Vol. 27, No. 1, págs. 14-21 (1999) em WO 00/37502 e WO 94/10202; ANGIOSTATIN, descrito por O'Reilly et al., Cell, Vol. 79, págs. 315-328 (1994); ENDOSTATIN, descrito por O'Reilly et al., Cell, Vol. 88, págs. 277-285 (1997); amidas de ácido antranílicos; ZD4190; ZD6474; SU5416; SU6668; bevacizumab; ou anticorpos de anti-VEGF ou anticorpos de receptor de anti-VEGF, por exemplo, rhuMAb e RHUFab; aptâmero de VEGF, por exemplo, Macugon; inibidores de FLT-4; inibidores de FLT-3; anticorpo de IgG1 de VEGFR-2; Angiozyme (RPI 4610); e Avastan.

O termo "terapia fotodinâmica", como aqui usado, refere-se à terapia que usa certas químicas conhecidas como agentes de fotossensibilização para tratar ou impedir cânceres. Exemplos de terapia fotodinâmicas incluem, mas não são limitadas a, tratamento com agentes, tais como, por exemplo, VISUDYNE e porfímero de sódio.

O termo "esteróide angiostático", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, agentes que bloqueiam ou inibem angiogênese, tais como, por exemplo, anecortave, triancinolona, hidrocortisona, 11- α -epiidrocotisol, cortexolona, 17 α -hidroxiprogesterona, corticosterona, desoxicorticosterona, 5 testosterona, estrona e dexametasona.

A frase "Implante contendo corticosteróides" como aqui usado, inclui, mas não é limitada a, agentes, tais como, por exemplo, fluocinolona e dexametasona.

O termo "antagonista de receptor AT1" como aqui usado, inclui, 10 mas não é limitado a, agentes, tais como DIOVAN.

O termo "inibidor de ACE" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a CIBACEN, benazepril, enazepril (LOTENSIN), captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, quinapril, ramipril, perindopril e trandolapril.

Outros agentes farmacologicamente ativos incluem, mas não são 15 limitados a, alcalóides de planta, agentes hormonais e antagonistas, modificadores de resposta biológica, preferivelmente linfocinas ou interferonas, oligonucleotídeos sem sentido ou derivados de oligonucleotídeo; ou agentes diversos ou agentes com outro mecanismo de ação ou desconhecido.

Em cada caso onde citações de pedidos de patente ou publica- 20 ções científicas são dadas, em particular com respeito às respectivas reivindicações compostas e os produtos finais dos exemplos de funcionamento, o assunto dos produtos finais, as preparações farmacêuticas e as reivindicações é por este meio incorporado no presente pedido por referência para estas publicações. Compreendidos são igualmente os estereoisômeros cor- 25 respondentes, como também as modificações de cristal correspondentes, por exemplo, solvatos e polimorfos que são revelados. Os compostos usados como ingredientes ativos nas combinações reveladas aqui podem ser preparados e administrados como descritos nos documentos citados, respectivamente.

30 A estrutura dos agentes ativos identificados por números de código, genérico pode ser tirada dos nomes comerciais da edição atual do compêndio padrão "The Merck Index" ou de bases de dados, por exemplo,

Patentes Internacionais, por exemplo, Publicações Mundiais IMS, ou as publicações mencionadas acima e abaixo. O conteúdo correspondente dos mesmos é por este meio incorporado por referência.

Será entendido que referências aos componentes (a) e (b) é significada também incluir os sais farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer das substâncias ativas. Se as substâncias ativas compreendidas pelos componentes (a) e/ou (b) tiverem, por exemplo, pelo menos um centro básico, elas podem formar sais de adição de ácido. Sais de adição de ácido correspondentes podem também ser formados tendo, se desejado, um centro básico adicionalmente presente. Substâncias ativas tendo um grupo ácido, por exemplo, COOH, podem formar sais com bases. As substâncias ativas compreendidas nos componentes (a) e/ou (b) ou uns sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos podem também ser usadas na forma de um hidrato ou inclui outros solventes usados para cristalização.

Desse modo, em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para a prevenção de tratamento de doenças proliferativas ou doenças que são desencadeadas através de angiogênese persistente em um mamífero, preferivelmente um paciente humano que compreende tratar o paciente simultânea ou seqüencialmente com quantidades farmaceuticamente eficazes de uma combinação de:

- (a) uma composição de antagonista de anticorpo de c-Met; e
- (b) um agente farmaceuticamente ativo.

Em modalidade preferida, a presente invenção fornece uma preparação farmacêutica compreendendo:

- (a) uma composição de antagonista de anticorpo de c-Met; e
- (b) um ou mais agentes farmaceuticamente ativos selecionados do grupo que consiste em um inibidor de aromatase; um antiestrogênio; um anti-andrógeno; um agonista de gonadorrelina; um inibidor de topoisomerase I; um inibidor de topoisomerase II; um agente ativo de microtúbulo; um agente de alquilação; um anti-metabólito anti-neoplástico; um composto de platina; um composto alvejando/diminuindo uma proteína ou atividade de cinase de lipídio ou uma atividade proteína ou de lipídio fosfatase, um composto

anti-angiogênico; um composto que induz diferenciação de processos celulares; anticorpos monoclonais; um inibidor de ciclooxigenase; um bisfosfonato; um inibidor de heparanase; um modificador de resposta biológica; um inibidor de isoformas oncogênicas de Ras; um inibidor de telomerase; um inibidor de protease, um inibidor de metaloproteinase de matriz, um inibidor de metionina aminopeptidase; um inibidor de proteassoma; agentes alvejando, diminuem ou inibem a atividade de Flt-3; um inibidor de HSP90; anticorpos antiproliferativos; um inibidor de HDAC; um composto que alveja, diminui ou inibe a atividade/função de mTOR serina/treonina cinase; antagonista de receptor de somatostatina; um composto anti-leucêmico; métodos danificadores de célula tumoral; um aglutinante de EDG; um inibidor de ribonucleotídeo reductase; um inibidor de S-adenosilmetionina descarboxilase; um anticorpo monoclonal de VEGF ou VEGFR; terapia fotodinâmica; um esteróide angiostático; um implante contendo corticosteróides; antagonista de receptor AT1; e um inibidor de ACE.

Qualquer da combinação de componentes (a) e (b), o método de tratar um animal de sangue quente compreendendo administrar estes dois componentes, uma composição farmacêutica compreendendo estes dois componentes para uso simultâneo, separado ou seqüencial, o uso da combinação para a demora de progressão ou o tratamento de uma doença proliferativa ou para a fabricação de uma preparação farmacêutica para estes propósitos ou um produto comercial compreendendo uma tal combinação de componentes (a) e (b), todos como mencionados ou definidos acima, será referido subsequente também como combinação da invenção (de forma que este termo refere-se a cada uma destas modalidades que desse modo pode substituir este termo onde apropriado).

Administração simultânea pode, por exemplo, ocorrer na forma de uma combinação fixa com dois ou mais ingredientes ativos, ou administrando dois ou mais ingredientes ativos que são formulados simultaneamente de modo independente. Uso seqüencial (administração) preferivelmente significa administração de um (ou mais) componente de uma combinação de uma só vez, outros componentes em um ponto de tempo diferente que é em

uma maneira crônica escalonada, preferivelmente de modo que a combinação mostra mais eficiência que os compostos simples administradas independentemente (especialmente mostrando sinergismo). Uso separado (administração) preferivelmente significa administração dos componentes da
 5 combinação independentemente um do outro em pontos de tempo diferentes, preferivelmente significando que os componentes (a) e (b) são administrados de modo que nenhuma sobreposição dos níveis de sangue mensuráveis de ambos os compostos está presente de uma maneira sobreposta (ao mesmo tempo).

10 Também combinações de dois ou mais de administração seqüencial, separada e simultânea são possível, preferivelmente de modo que a combinação de componente-fármacos mostra um efeito terapêutico conjunto que excede o efeito encontrado quando a combinação de componente-fármacos for usada independentemente em intervalos de tempo tão grandes
 15 que nenhum efeito mútuo em sua eficiência terapêutica possa ser encontrados, um efeito sinérgico sendo especialmente preferido.

O termo "demora de progressão" como aqui usado significa administração da combinação em pacientes que estão em um pré-estágio ou em uma fase prematura, da primeira manifestação ou uma recaída da doença a ser tratada, em que os pacientes, por exemplo, uma pré-forma da doença correspondente é diagnosticada ou que os pacientes estão em uma
 20 condição, por exemplo, durante um tratamento médico ou uma condição que é o resultado de um acidente sob a qual é provável que uma doença correspondente se desenvolverá.

25 "Junto terapeuticamente ativo" ou "efeito terapêutico em conjunto" significa que os compostos podem ser dados separadamente (em uma maneira crônica escalonada, especialmente uma maneira seqüência-específica) em tais intervalos de tempo que eles preferivelmente, no animal de sangue quente, especialmente ser humano, a ser tratado, ainda mostram
 30 uma interação (preferivelmente sinérgica) (efeito terapêutico em conjunto). Se este for o caso, pode inter alia ser determinado seguindo os níveis de sangue, mostrando que ambos os compostos estão presentes no sangue do

ser humano a ser tratado pelo menos durante certos intervalos de tempo.

"Farmaceuticamente eficaz" preferivelmente refere-se a uma quantidade que é terapeuticamente ou em um sentido mais vasto também profilaticamente eficaz contra a progressão de uma doença proliferativa.

5 O termo "um pacote comercial" ou "um produto", como aqui usado especialmente define um "kit de partes" no sentido que os componentes (a) e (b) como definidos acima podem ser dosados independentemente ou pelo uso de combinações fixas diferentes com quantidades distinguidas dos componentes (a) e (b), isto é, simultaneamente ou em pontos de tempo diferentes. Além disso, estes termos compreendem um pacote comercial que
10 compreende (especialmente combinando) como componentes de ingredientes ativos (a) e (b), juntos com as instruções para uso simultâneo, seqüencial (cronologicamente escalonada, em seqüência tempo-específica, preferencialmente) ou (menos preferivelmente) separados dos mesmos na demora de
15 progressão ou tratamento de uma doença proliferativa. As partes do kit de partes podem ser depois, por exemplo, administradas simultânea ou cronologicamente escalonadas, que é em pontos de tempo diferentes e com intervalos de tempo iguais ou diferentes para qualquer parte do kit de partes. Muito preferivelmente, os intervalos de tempo são escolhidos de modo que o
20 efeito na doença tratada no uso combinado das partes é maior que o efeito que seria obtido através do uso de qualquer um dos pares de combinação (a) e (b) (como pode ser determinado de acordo com os métodos padrões. A razão das quantidades total do par de combinação (a) para o par de combinação (b) a serem administrados na preparação combinada pode ser varia-
25 da, por exemplo, para contender com as necessidades de uma subpopulação de paciente a ser tratado ou as necessidades do paciente simples cujas necessidades diferentes podem ser devido à doença particular, idade, sexo, peso do corpo, etc. dos pacientes. Preferivelmente, há pelo menos um efeito benéfico, por exemplo, uma intensificação mútua do efeito dos pares de combinação (a) e (b), em particular um efeito mais aditivo que conseqüentemente poderia ser alcançado com doses inferiores de cada um dos
30 fármacos combinados, respectivamente, que tolerável no caso de tratamento

com os fármacos individuais apenas sem combinação, produzindo efeitos vantajosos adicionais, por exemplo, menos efeitos colaterais ou um efeito terapêutico combinado em uma dosagem não-eficaz de um ou ambos dos pares de combinação (componentes) (a) e (b), e muito preferivelmente um
5 sinergismo forte dos pares de combinação (a) e (b).

Tanto no caso do uso da combinação de componentes (a) e (b) e do pacote comercial, é qualquer combinação de uso simultâneo, seqüencial e separado também possível, significando que os componentes (a) e (b) podem ser administrados em um ponto de tempo simultaneamente, seguido
10 por administração de apenas um componente com toxicidade de hospedeiro mais baixa qualquer cronicamente, por exemplo, mais de 3-4 semanas de doseamento diário, em um ponto de tempo mais tarde e subseqüentemente o outro componente ou a combinação de ambos os componentes em um ponto de tempo ainda posterior (em cursos de tratamento de combinação de
15 fármaco subseqüentes para um efeito ótimo anti-tumoral) ou outros.

A COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO pode também ser aplicada em combinação com outros tratamentos, por exemplo, intervenção cirúrgica, hipertermia e/ou terapia de irradiação.

As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção podem ser preparadas através de meios convencionais e podem ser
20 adequadas para administração enteral, tal como oral ou retal, e parenteral para mamíferos incluindo o homem, compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um inibidor de VEGF e pelo menos um agente farmacêuticamente ativo sozinho ou em combinação com um ou mais veículos
25 farmacêuticamente aceitáveis, especialmente aqueles adequados para aplicação enteral ou parenteral.

As composições farmacêuticas compreendem de cerca de 0,00002 a cerca de 100 %, especialmente, por exemplo, no caso de diluições de infusão que estão prontas para o uso, de 0,0001 a 0,02 %, ou, por
30 exemplo, no caso de concentrados de injeção ou infusão ou formulações especialmente parenterais, de cerca de 0,1 % a cerca de 95 %, preferivelmente de cerca de 1 % a cerca de 90 %, mais preferivelmente de cerca de

20 % a cerca de 60 % de ingrediente ativo (em peso de peso, em cada caso). Composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser, por exemplo, em forma de dose de unidade, tais como na forma de ampolas, frascos, drágeas, tabletes, sacos de infusão ou cápsulas.

5 A dosagem eficaz de cada um dos pares de combinação empregados em uma formulação da presente invenção podem variar, dependendo do composto particular ou composições farmacêuticas empregadas, do modo de administração, da condição sendo tratada e da severidade da condição sendo tratada. Médico, clínico ou veterinário de habilidade usual podem
10 facilmente determinar a quantidade eficaz de cada um dos ingredientes ativos necessários para impedir, tratar ou inibir o progresso da condição.

Tirfostinas, especialmente Adafostina, são preferivelmente administradas a um animal de sangue quente, especialmente um ser humano em uma dosagem na faixa de cerca de 1-6000 mg/dia, mais preferivelmente
15 25-5000 mg/dia, o mais preferivelmente 50-4000 mg/dia. A menos que do contrário declarado aqui, o composto é preferivelmente administrado de um a 5, especialmente de 1-4 vezes por dia.

Preparações farmacêuticas para a terapia de combinação para administração enteral ou parenteral são, por exemplo, aquelas em formas de
20 dosagem de unidade, tais como tabletes revestidos com açúcar, cápsulas ou supositórios, e além disso ampolas. Se não indicado do contrário, estas formulações são preparadas através de meios convencionais, por exemplo, por meio de processos convencionais de mistura, granulação, revestimento com açúcar, dissolução ou liofilização. Será apreciado que o conteúdo de unidade de um par de combinação não contido em uma dose individual de cada
25 forma de dosagem em si mesmo não necessita constituir uma quantidade eficaz uma vez que a quantidade eficaz necessária pode ser alcançada por administração de uma pluralidade de unidades de dosagem. Alguém de habilidade na técnica tem a habilidade para determinar quantidades farmacêuticamente eficazes apropriadas dos componentes de combinação.
30

Preferivelmente, os compostos ou os sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, são administrados como uma formulação farmacêu-

tica oral na forma de um tablete, cápsula ou xarope; ou como injeções parenterais se apropriado.

Na preparação das composições para administração oral, quaisquer meios farmaceuticamente aceitáveis podem ser empregados tais como

5 água, glicóis, óleos, alcoóis, agentes aromatizantes, conservantes, agentes de coloração. Veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem amidos, açúcares, celulosas microcristalinas, diluentes, agentes granulantes, lubrificantes, aglutinantes, agentes desintegrantes.

Soluções do ingrediente ativo, e também suspensões, e soluções ou suspensões aquosas especialmente isotônicas, são úteis para administração parenteral do ingrediente ativo, isto sendo possível, por exemplo, no caso de composições liofilizadas que compreendem o ingrediente ativo sozinho ou junto com um veículo farmaceuticamente aceitável, por exemplo, manitol, para tais soluções ou suspensões serem produzidas antes

10 do uso. As composições farmacêuticas podem ser esterilizadas e/ou compreender excipientes, por exemplo, conservantes, estabilizantes, agentes intumescentes e/ou agentes emulsificantes, solubilizantes, sais para regular a pressão osmótica e/ou tampões, e são preparadas de uma maneira conhecida per se, por exemplo, por meio de processos de dissolução ou liofilização convencionais. As soluções ou suspensões podem compreender

15 substâncias de aumento de viscosidade, tais como carboximetilcelulose de sódio, carboximetilcelulose, dextrana, polivinilpirrolidona ou gelatina. Suspensões em óleo compreendem como o componente de óleo os óleos vegetais, sintéticos ou semi-sintéticos habituais para propósitos de injeção.

20

O agente isotônico pode ser selecionado de qualquer um daqueles conhecidos na técnica, por exemplo manitol, dextrose, glicose e cloreto de sódio. A formulação de infusão pode ser diluída com o meio aquoso. A quantidade de meio aquoso empregado como um diluente é escolhida de acordo com a concentração desejada de ingrediente ativo na solução de infusão. Soluções de infusão podem conter outros excipientes comumente

25

30 empregados em formulações a ser administradas intravenosamente tais como antioxidantes.

A presente invenção também refere-se a "uma preparação combinada" que, como aqui usada, especialmente define um "kit de partes" no sentido que os pares de combinação (a) e (b) como definidos acima podem ser dosados independentemente ou por uso de combinações fixas diferentes com quantidades distinguidas dos pares de combinação (a) e (b), isto é, simultaneamente ou em pontos de tempo diferentes. As partes do kit de partes podem depois, por exemplo, ser administradas simultânea ou cronologicamente escalonadas, que é em pontos de tempo diferentes e com intervalos de tempo iguais ou diferentes para qualquer parte do kit de partes. A razão das quantidades totais do par de combinação (a) para o par de combinação (b) a serem administradas na preparação combinada pode ser variada, por exemplo, para contender com as necessidades de uma sub-população de pacientes a ser tratada ou as necessidades do paciente apenas com base na severidade de qualquer efeito colateral que o paciente sofre.

15 USOS E MÉTODOS DA INVENÇÃO

Os anticorpos (e imunoconjugados e moléculas biespecíficas) da presente invenção têm diagnóstico *in vitro* e *in vivo* e utilidades terapêuticas. Por exemplo, estas moléculas podem ser administradas às células em cultura, por exemplo *in vitro* ou *in vivo*, ou em um sujeito, por exemplo, *in vivo*, para tratar, impedir ou diagnosticar uma variedade de distúrbios. O termo "sujeito" como aqui usado é intencionado a incluir os animais humanos e não-humanos. Animais não-humanos incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos, tais como primatas não-humanos, ovelhas, cachorros, gatos, vacas, cavalos, galinhas, e não-mamíferos, tais como pássaros, anfíbios e répteis. Os métodos são particularmente adequados para tratar pacientes humanos tendo um distúrbio associado à expressão aberrante de c-Met. Quando os anticorpos para c-Met forem administrados junto com outro agente, os dois ou podem ser administrados em ordem ou simultaneamente.

Em uma modalidade, os anticorpos (e imunoconjugados e moléculas biespecíficas) da invenção podem ser usados para detectar níveis de c-Met, ou níveis de células contendo c-Met. Isto pode ser alcançado, por exemplo, contatando uma amostra (tal como uma amostra *in vitro*) e uma a-

mostra de controle com o anticorpo de anti-c-Met sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo e c-Met. Qualquer complexo formado entre o anticorpo e c-Met é detectado e comparado na amostra e no controle. Por exemplo, métodos de detecção padrões, bem conhecidos na técnica, tais como ELISA e ensaios citométricos de fluxo, podem ser executados usando as composições da invenção.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção também fornece métodos para detectar a presença de c-Met (por exemplo, antígeno de c-Met humano) em uma amostra, ou medir a quantidade de c-Met, compreendendo contatar a amostra, e uma amostra de controle, com um anticorpo da invenção, ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo para que especificamente ligue c-Met, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou porção do mesmo e c-Met. A formação de um complexo é depois detectada, em que uma diferença no complexo de formação entre a amostra comparada à amostra de controle é indicativa da presença de c-Met na amostra.

Também dentro do escopo da invenção estão kits que consistem nas composições (por exemplo, anticorpos, anticorpos humanos, imunocombinados e moléculas biespecíficas) da invenção e instruções para o uso. O kit pode também conter pelo menos um reagente adicional, ou um ou mais anticorpos adicionais da invenção (por exemplo, um anticorpo tendo uma atividade complementar que liga a um epítipo no antígeno alvo distinto do primeiro anticorpo). Kits tipicamente incluem uma marcação que indica o uso intencionado dos conteúdos do kit. O termo marcação inclui qualquer escritura, ou material registrado provido dentro ou com o kit, ou que do contrário acompanha o kit.

A invenção tendo sido descrita por completo, é também ilustrada pelos exemplos a seguir e reivindicações que são ilustrativos e não são significadas ser limitativas também. Aqueles versados na técnica reconhecerão ou poderão apurar usando experimentação mais rotineira, numerosos equivalentes para os procedimentos específicos descritos aqui. Tais equivalentes estão dentro do escopo da presente invenção e reivindicações. Os conteú-

dos de todas as referências, incluindo patentes emitidas e pedidos de patente publicados, citados ao longo deste pedido são por este meio incorporados por referência.

EXEMPLOS

5 EXEMPLO 1: GERAÇÃO DE ANTICORPOS c-Met-ESPECÍFICOS HUMANOS DA BIBLIOTECA HUCAL GOLD®

Anticorpos terapêuticos contra proteína humana de c-Met são gerados por seleção de clones tendo afinidades de ligação altas, usando como a fonte de anticorpo proteínas variantes de uma biblioteca de exibição de fago comercialmente disponível, a biblioteca MorphoSys HuCAL GOLD®. HuCAL GOLD® é uma biblioteca de Fab (Knappik et al., 2000 J. Mol. Biol. 296:57-86; Krebs et al., 2001 J Immunol. Methods 254:67-84; Rauchenberger et al., 2003 J Biol Chem. 278(40):38194-38205) em que todas as CDRs são diversificadas através de mutação apropriada, e empregando a tecnologia de CysDisplay™ para ligar fragmentos de Fab à superfície de fago (WO 15 01/05950 Löhning 2001).

PROCEDIMENTOS GERAIS: SALVAMENTO DE FAGEMÍDEO, AMPLIFICAÇÃO DE FAGO, E PURIFICAÇÃO

A biblioteca HuCAL GOLD® é amplificada em meio bacteriano rico padrão (2xYT) contendo 34 µg/ml cloranfenicol e 1 % glicose (2xYT-CG). Após infecção das células em uma OD_{600nm} de 0,5 com fagos ajudantes de VCSM13 (incubando a mistura de células e fago durante 30 min a 37° C sem agitação seguido por 30 min a 37° C agitando a 250 rpm), as células são centrifugadas (4120 g; 5 min; 4° C), são re-suspensas em 2xYT / 25 34 µg/ml cloranfenicol / 50 µg/ml canamicina / 0,25 mM IPTG, e crescidas durante a noite a 22° C. Ao término deste período as células são removidas através de centrifugação, e os fagos são precipitados com PEG duas vezes do sobrenadante, são re-suspensos em PBS / 20 % glicerol e são armazenados a -80° C.

30 Amplificação de fago entre dois ciclos de *panning* é conduzida como segue: células de TG1 de cepa de *E. coli* de fase de meio-log são infectadas com fagos que são eluídos seguindo a seleção com proteína de c-Met,

e são colocados em placa sobre LB-ágar suplementado com 1 % de glicose e 34 µg/ml de cloranfenicol (placas de LB-CG). Após incubação durante a noite das placas a 30° C, colônias bacterianas são raspadas da superfície de ágar, e usadas para inocular caldo de 2xYT-CG para obter uma OD_{600nm} de 0,5, depois os fagos ajudantes de VCSM13 são adicionados para obter uma infecção produtiva como descrita acima.

PRÉ-EXPERIMENTOS PARA *PANNING* DE SOLUÇÃO USANDO CONTAS MAGNÉTICAS STREP-TACTIN

O marcador Strep II foi relatado ter baixa afinidade para a matriz de Strep-Tactin ($K_D \sim 1 \mu M$ de acordo com (Voss e Skerra, 1997 Protein Eng. 10:975-982), portanto, um pré-experimento é executado para avaliar a conveniência de usar contas de MagStrep revestidas com Strep-Tactin pela captura do antígeno durante as seleções de anticorpo, e evitar perda de antígeno durante os *pannings*.

Para aquele propósito, 8 mg de contas de MagStrep são incubados com 46 µg de c-Met marcado com His-Strep por 1 h em temperatura ambiente e a amostra é dividida em quatro tubos de Eppendorf pré-bloqueados. Um tubo serve como o controle positivo (nenhuma lavagem) e as outras três amostras são lavadas com severidades diferentes de acordo com a seção de *panning* manual de HuCAL GOLD®. Detecção de ligação do c-Met marcado com His-Strep às contas de MagStrep (contas magnéticas revestidas com Strep-Tactin obtidas de IBA, Göttingen, Alemanha) é executada em BioVeris usando um anticorpo de anti-c-Met de cabra e um anticorpo de detecção de anti-cabra marcado com Rubídio.

Como mostrado nas figuras aqui, nenhuma perda significativa de c-Met marcado com His-Strep das contas revestidas com Strep-Tactin é detectável quando as contas não-lavadas forem comparadas com aquelas contas lavadas com severidades de HuCAL® diferentes. Desse modo, o c-Met marcado com His-Strep parece ser adequado para o uso nos *pannings* de solução com contas magnéticas revestidas com Strep-Tactin (contas de MagStrep).

SELEÇÃO POR *PANNING* DE ANTICORPOS c-Met-ESPECÍFICOS DA BI-

BLIOTECA

Para a seleção de anticorpos que reconhecem o c-Met humano, duas estratégias de *panning* são aplicadas.

Em geral, fago-anticorpos HuCAL GOLD® são divididos em quatro fundos gerais compreendendo combinações diferentes de genes de V_H principais (fundo geral 1 continha VH1/5 λ k; fundo geral 2 continha VH3/ λ k; fundo geral 3 continha de VH2/4/6 λ k; e fundo geral 4 continha VH1-6/ λ k). Estes fundos gerais são submetidos individualmente a dois ciclos de *panning* de solução em c-Met marcado com capturado com His-Strep sobre contas magnéticas de StrepTactin (contas de Mega Strep; IBA), e para o terceiro ciclo de seleção apenas, ou em c-Met marcado com His-Strep capturado sobre contas magnéticas de StrepTactin ou em proteína de c-Met humana marcada com APP capturada por contas de Estreptavidina (Dynabeads® M-280 Streptavidin; Dynal) com um anticorpo de anti-APP biotinilado.

Especificamente, para o *panning* de solução usando c-Met marcado com His-Strep acoplado as contas magnéticas de StrepTactin, o protocolo a seguir é aplicado: tubos pré-bloqueados são preparados (1,5 ml tubos de Eppendorf) por tratamento com 1,5 ml 2x ChemiBLOCKER diluído 1:1 com PBS durante noite a 4° C. Contas pré-bloqueadas são preparadas através de tratamento como segue: 580 μ l (28 mg contas) de contas magnéticas de StrepTactin são lavados uma vez com 580 μ l de PBS e re-suspensas em 580 μ l de 1x ChemiBLOCKER (diluído em um volume 1x PBS). Bloqueio das contas é executado nos tubos pré-bloqueados durante a noite a 4° C.

Partículas de fago diluídas em PBS a um volume final de 500 μ l para cada condição de *panning* são misturadas com 500 μ l 2x ChemiBLOCKER / 0,1 % Tween e persistidas durante uma hora em temperatura ambiente em uma roda giratória. Pré-adsorção das partículas de fago para remoção de StrepTactin ou fagos de ligação de conta é executada duas vezes: 160 μ l de contas magnéticas bloqueadas com StrepTactin (4 mg) são adicionados às partículas de fago bloqueadas, e são incubados durante 30 min em temperatura ambiente em uma roda giratória. Após separação das contas por um dispositivo magnético (Dynal MPC-E), o sobrenadante de fago (~1,1 ml)

é transferido para um tubo de reação fresco, bloqueado e pré-adsorção é repetida usando 160 µl de contas bloqueadas durante 30 min. Depois, c-Met marcado com His-Strep, ou 400 nM ou 100 nM, é adicionado às partículas de fago bloqueadas em um tubo de reação fresco, bloqueado de 1,5 ml e a
5 mistura é incubada por 60 min em temperatura ambiente em uma roda giratória.

Os complexos de fago-antígeno são capturados usando 320 µl ou 160 µl de contas magnéticas bloqueadas com StrepTactin adicionados aos fundos gerais de 400 nM ou 100 nM de *panning* de fago, respectivamente
10 te sendo depois incubados por 20 min em temperatura ambiente em uma roda giratória. Partículas de fago ligadas às contas magnéticas de StrepTactin são colhidas novamente com o separador de partícula magnético.

Contas são depois lavadas sete vezes com PBS/ 0,05 % Tween (PBST), seguido lavando mais três vezes com PBS apenas. Eluição das par-
15 tículas de fago das contas magnéticas de StrepTactin são executadas por adição de 200 µl de 20 mM DTT em 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 para cada tubo por 10 min. O eluato é colhido, e as contas são lavadas uma vez com 200 µl PBS e o eluato de PBS é adicionado ao eluato de DTT. Esta amostra de eluato é usada para infectar 14 ml de uma cultura de TG-1 de *E. coli* que é
20 previamente crescida a uma OD_{600nm} de 0,6-0,8.

Após infecção e centrifugação subsequente por 10 min a 5000 rpm cada pelota bacteriana foi re-suspensa em 500 µl de meio 2xYT, colocada em placa sobre placas de ágar 2xYT-CG e incubadas durante a noite a 30° C. Na manhã seguinte, as colônias resultantes são raspadas das placas
25 e o fago é preparado por salvamento e amplificação como descrito acima.

O segundo ciclo de *pannings* de solução em c-Met marcado com His-Strep é executado de acordo com o protocolo do primeiro ciclo, exceto que quantidades decrescentes de antígeno são usadas (50 nM, e 10 nM) e a severidade do procedimento de lavagem é alterada apropriadamente.

30 Duas estratégias de *panning* diferentes são aplicadas para o terceiro ciclo de seleção: a produção de fago amplificada do segundo ciclo de *panning* é dividida e submetida a duas condições de *panning* diferentes. A

primeira metade da produção de fago é usada para a estratégia de *panning* padrão em c-Met humano marcado com His-Strep capturado sobre contas de StrepTactin como descrito acima (quantidades de antígeno são 10 nM ou 1 nM, respectivamente).

- 5 A segunda variação de *panning* para o terceiro ciclo de seleção é executada em c-Met humano marcado com APP. Proteína de c-Met marcada com APP a uma concentração final de 50 nM ou 10 nM é misturada com 1 ml de partículas de fago pré-clareadas da segunda rodada, e a mistura é incubada em temperatura ambiente durante 1 hora em uma roda giratória. Em paralelo, 8 mg de Dynabeads M-280 Streptavidin pré-bloqueadas (Dyna)
- 10 (Dyna) são incubados com 40 µg de anticorpo de anti-APP de camundongo biotinizado durante 30 min em temperatura ambiente em uma roda giratória seguida por duas etapas de lavagem com PBST. Os complexos pré-formados que consistem em fago-anticorpos ligados a c-Met marcado com
- 15 APP são capturados pelas contas magnéticas de M-280 Streptavidin revestidas com anti-APP durante 30 min em temperatura ambiente. Eluição e amplificação de fago são executadas como descrito acima.

SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DE FRAGMENTOS DE Fab SOLÚVEIS

- As inserções de codificação de FAB dos fagemídeos HuCAL
- 20 GOLD® selecionados são subclonadas em vetor de expressão pMORPH®X9_Fab_FH (vide figuras) para facilitar a expressão rápida e eficiente dos Fabs solúveis. Para este propósito, o DNA de plasmídeo dos clones selecionados é digerido com enzima de restrição endonucleases *Xba*I e *Eco*RI, assim excisando a inserção de codificação de Fab (ompA-VLCL e phoA-Fd).
- 25 Esta inserção é depois clonada em vetor de expressão digerido com *Xba*I/*Eco*RI pMORPH®X9_Fab_FH.

Proteínas de Fab são expressadas deste vetor, e como resultado carregam dois marcadores C-terminais (FLAG™ e 6xHis, respectivamente) para detecção e purificação.

- 30 MICROEXPRESSÃO DE ANTICORPOS DE Fab HUCAL GOLD® EM *E. coli*

Para obter quantidades suficientes de proteína codificadas por cada um dos clones obtidos acima, colônias bacterianas simples resistentes

a cloranfenicol são selecionadas após subclonagem dos Fabs selecionados no vetor de expressão de pMORPH@X9_Fab_FH. Cada uma destas colônias é depois usada para inocular os poços de uma placa de microtitulação de 96 poços estéreis, com cada poço contendo 100 µl de meio de 2xYT-CG por poço, e bactérias são crescidas durante a noite a 37° C. Uma amostra (5 µl) de cada cultura de TG-1 de *E. coli* é transferida para uma placa de microtitulação de 96 poços fresca, estéril pré-enchida com 100 µl de meio 2xYT suplementado com 34 µg/ml de cloranfenicol e 0,1 % de glicose por poço. As placas de microtitulação são incubadas a 30° C com agitação a 400 rpm em um agitador de microplaca até que as culturas fiquem ligeiramente turvas (~2-4 h) com uma OD_{600nm} de cerca de 0,5.

Para expressão no formato destas placas, 20 µl de meio 2xYT suplementado com 34 µg/ml de cloranfenicol e 3 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) são adicionados por poço (concentração final 0,5 mM IPTG), as placas de microtitulação vedadas com fita permeável a gás, e incubadas durante a noite a 30° C agitando a 400 rpm.

GERAÇÃO DE LISADOS DE CÉLULAS INTEIRAS (EXTRATOS DE BEL)

Para cada poço das placas de expressão, 40 µl tampão de BEL (2xBBS / EDTA: 24,7 g/l de ácido bórico, 18,7 g de NaCl/l, 1,49 g de EDTA/l, pH 8,0) contendo 2,5 mg/ml de lisozima são adicionados, e as placas são incubadas por 1 h a 22° C em um agitador de placa de microtitulação (400 rpm). Os extratos de BEL são usados para análise de ligação por FMAT (vide Exemplo 2).

EXPRESSÃO DE QUANTIDADES EM MICROGRAMA DE ANTICORPOS DE Fab DE HUCAL GOLD® EM *E. coli* E PURIFICAÇÃO

Expressão de fragmentos de Fab codificados por pMORPH@X9_Fab_FH em células de TG1 F de *E. coli* é realizada em tubos de plástico de 50 ml. Para este propósito, pré-culturas inoculadas com clones simples são crescidas em meio 2xYT-CG durante a noite a 30° C. Na manhã seguinte, 50 µl de cada pré-cultura são usados para inocular 25 ml de meio 2xYT suplementado com 34 µg/ml de Cloranfenicol, 1 mM de IPTG, e 0,1 % de glicose em tubos de plástico estéreis de 50 ml, e incubados durante a

noite a 30° C. As células de *E. coli* são colhidas, as pelotas de célula geladas e por fim rompidas com Bicho Buster (Novagen). Os fragmentos de Fab são isolados usando Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden, Alemanha).

EXPRESSÃO DE QUANTIDADES EM MILIGRAMA DE ANTICORPOS DE

5 Fab DE HUCAL GOLD® EM *E. coli* E PURIFICAÇÃO

Expressão de fragmentos de Fab codificados por pMORPH®X9_Fab_FH em células TG1 F é realizada em culturas de frasco de agitador usando 750 ml de meio de 2xYT suplementado com 34 µg/ml de clo-ranfenicol. Culturas são agitadas a 30° C até que a OD_{600nm} alcançasse 0,5.

10 Expressão é induzida por adição de 0,75 mM de IPTG seguido por incubação por 20 h a 30° C. As células são rompidas usando lisozima, e fragmentos de Fab são isolados através de cromatografia de Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemanha). Concentrações de proteína são determinadas através de UV-espectrofotometria (Krebs et al., 2001).

15 EXEMPLO 2: IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS DE HUCAL® c-Met-ESPECÍFICOS

Extratos de BEL de clones de *E. coli* individuais selecionados pelas estratégias de *panning* supracitadas são analisados por Tecnologia de Ensaio de Microvolume Fluorométrico (FMAT™, analisador de Sistema de

20 Detecção Celular 8200, Applied Biosystems), para identificar dos clones de codificação de Fabs c-Met-específico.

ANÁLISE DE LIGAÇÃO COM BASE EM TECNOLOGIA DE ENSAIO DE MICROVOLUME FLUOROMÉTRICO (FMAT) PARA DETECÇÃO DE Fabs DE LIGAÇÃO DE c-Met DE LISADOS BACTERIANOS

25 Para a detecção de anticorpos de Fab de ligação a c-Met de lisados de *E. coli* (Extratos de BEL), ligação é analisada com o sistema de detecção celular FMAT 8200 (Applied Biosystems). Para acoplar c-Met marcado com His-Strep sobre contas de M-450 Epoxy (Dyna), uma amostra de 300 µl de contas de M-450 Epoxy ($1,2 \times 10^8$ contas) é transferida para um

30 tubo de reação e capturadas com um separador de partícula magnético. O sobrenadante é removido e as contas são lavadas quatro vezes em 1 ml de 100 mM tampão de fosfato de sódio, pH 7,4. Para revestimento de antígeno,

60 µg de c-Met marcado com His-Strep são adicionados à suspensão de conta em 150 µl de 100 mM tampão de fosfato de sódio, pH 7,4. A suspensão de antígeno-conta é incubada por 16 h em temperatura ambiente em uma roda giratória. As contas revestidas são depois lavadas três vezes com
5 PBS e re-suspensas em um volume final de 250 µl PBS.

Para cada placa de 384 poços, uma mistura de 20 ml de PBS contendo 3 % BSA, 0,005 % Tween-20, 4 µl de contas revestidas com c-Met ($1,9 \times 10^6$ contas) e 4 µl de anticorpo de detecção Cy5™ são preparados. Uma amostra de 45 µl desta solução é dispensada por poço em uma placa
10 de FMAT de fundo preto/clara de 384 poços (Applied Biosystems). O extrato de BEL contendo Fab (5 µl) é adicionado a cada poço. As placas de FMAT são incubadas em temperatura ambiente durante a noite. Na manhã seguinte as placas são analisadas no Sistema de Detecção Celular 8200 (Applied Biosystems).

15 São obtidos clones positivos, e as seqüências de cadeia pesada e leve dos clones rendendo sinais positivos, específicos em FMAT são analisadas. Clones de anti-c-Met únicos (não-redundantes) são identificados mostrando ligação suficientemente forte a c-Met humano. Estes clones são expressos, purificados e testados para afinidade e em ensaios funcionais.

20 DETERMINAÇÃO DAS AFINIDADES NANOMOLARES USANDO RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE

Usando estes clones, análise de SPR cinética é executada em uma fatia de CM5 (Biacore, Suécia) que tinha sido revestida com uma densidade de ~400 RU de qualquer c-Met humano recombinante, em 10 mM de
25 acetato de Na pH 4,5 usando química de acoplamento de amina de EDC-NHS padrão. Uma quantidade comparável de albumina de soro humana (HSA) é imobilizada na célula de fluxo de referência. PBS (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄ pH 7,4) é usado como o tampão corrente. As preparações de Fab são aplicadas em série de concentra-
30 ção de 16 - 500 nM a uma taxa de fluxo de 20 µl/min. Fase de associação é ajustada para 60 s e fase de dissociação para 120 s. Um sumário das afinidades em nM para c-Met humano é mostrado na Tabela 1 aqui.

Tabela 1. Afinidades de Fabs selecionado para humano, c-Met

Anticorpo	K _D [nM] c-Met humano BIAcore
4536	1,4
4537	1,7
4541	2,6
4682	11,2
4687	0,8
4690	66,0

EXEMPLO 3: ANÁLISE QUANTITATIVA DE AFINIDADES DE LIGAÇÃO:
DETERMINAÇÃO DE CANDIDATOS DE Fab de c-Met ANTI-HUMANO QUE
LIGAM c-Met DE COMPRIMENTO TOTAL

5 DETERMINAÇÃO DE AFINIDADE

A fim de também caracterizar os anticorpos de anti-c-Met, a afinidade para o humano de comprimento total e c-Met cinomólogo é determinada. GTL16, células CHO que supra-expressam c-Met cinomólogo ou células 4MBr-5 de reso são lavadas, tripsinadas, e suspensas em PBS contendo 3 % FCS (3 % FCS/PBS) a 4º C. 2-5x10⁵ células/amostra são re-suspensas em 140 µl de 3 % FCS//PBS contendo 5 µg/ml de Fabs de anti-cMet purificados ou diluições seriais dos mesmos. Como um controle positivo 5 µg/ml de DO24 (IgG2a de camundongo), c-Met ANTI-HUMANO é usado. As células são incubadas durante 30-60 minutos a 4º C antes de serem empelotadas através de centrifugação para 2 min a 2000 rpm (716 g) a 4º C e lavadas em 200 µl em 3 % FCS/PBS esfriado. As células são novamente empelotadas por centrifugação e o PBS suavemente removido. Células são re-suspensas em 100 µl de IgG anti-humana de cabra (H+L) conjugada com PE (Jackson No de Cat. 109-116-088) diluída 1:200 em 3 % FCS/0,02 % NaN₃/PBS. Para controle positivo, IgG de anti-camundongo de cabra de (H+L) conjugada com PE (Jackson No de Cat. 115-116-146) diluída 1:200 em 3 % FCS/PBS é usada. As amostras são incubadas na escuridão por 30-60 min a 4º C. Seguindo centrifugação e lavando em 200 µl de 3 %

FCS/0,02 % NaN_3 /PBS as células são re-suspensas em 100 μl de 3 % FCS/PBS e ensaiadas usando arranjo de FACS ou FACS-Calibur.

Os dados de afinidade resumidos no c-Met humano e cinomólo-
go estão mostrados na Tabela 2 aqui. Todos os seis Fabs testados mostra-
dos na Tabela 2 são observados ter afinidade a c-Met humano abaixo de
100 nM. Nove clones também produzem anticorpos com afinidades menores
que 10 nM. Em todos os casos testados, as afinidades para c-Met cinomólo-
go e de camundongo são quase idênticas às para c-Met humano.

TABELA 2. DADOS DE AFINIDADE DE Fabs SELECIONADOS NO C-MET
HUMANO, DE RESO E CINOMÓLOGO

Anticorpo	K_D [nM] c-Met humano GTL-16	K_D [nM] c-Met cino CHO-cMet	K_D [nM] c-Met de reso 4MBr-5
4536	0,4	0,5	0,1
4537	2,6	ND	0,1
4541	0,5	ND	0,1
4682	1,2	0,3	0,3
4687	5,7	1,1	1,2
4690	1,1	ND	0,1

EXEMPLO 4: PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE HUCAL® CONVERSÃO PARA O FORMATO DE IgG

Dimerização mediada por anticorpo pode resultar em ativação
agonística da atividade de c-Met de tirosina cinase. Portanto Fabs, selecio-
nados em base de c-Met purificado de ligação, são convertidos no formato
de IgG. Para expressar imunoglobulina de comprimento total (Ig), fragmen-
tos de domínio variável de cadeias pesadas (V_H) e leves (V_L) ou são subclo-
nados dos vetores de expressão de Fab pMORPH®X9_FH no pMOR-
PH®_h_Ig ou na série de vetor pMORPH®2_h_Ig para IgG1 humana e IgG4
humana. Enzimas de restrição *EcoRI*, *MfeI*, e *BlnI* são usadas para subclo-
nagem do fragmento de domínio de V_H em pMORPH®_h_IgG1 e pMOR-
PH®_h_IgG4. Enzimas de restrição *MfeI* e *BlnI* são usadas para subclona-

gem do fragmento de domínio V_H em pMORPH@2_h_IgG1f e pMORPH@2_h_IgG4. Subclonagem do fragmento de domínio V_L em pMORPH@_h_Igk e pMORPH@2_h_Igk é executada usando os sítios de *EcoRV* e *BsWI*, enquanto subclonagem em pMORPH@_h_Igy e pMORPH@2_h_Igy2 é feita usando *EcoRV* e *HpaI*.

EXPRESSÃO TRANSIENTE E PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA

Células de HEK293 são transfeccionadas com uma quantidade equimolar de vetores de expressão de IgG de cadeia pesada e leve. Nos dias 4 ou 5 após transfecção, o sobrenadante de cultura de célula é colhido. Após ajustar o pH do sobrenadante para 8,0 e filtração estéril, a solução é submetida à cromatografia de coluna de proteína padrão A (Poros 20A, PE Biosystems).

CONVERSÃO DE Fabs PARENTAIS NOS FORMATOS DE IgG1 E IgG4

Em paralelo ao começo da maturação de afinidade, inserções são clonadas nos vetores de expressão pMORPH@_h_IgG1 e pMORPH@_h_IgG4. Expressão de escala pequena é executada por transfecção transiente das células HEK293 e as imunoglobulinas de comprimento total são purificadas do sobrenadante de cultura de célula.

IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS DE c-Met ANTI-HUMANO DE IgG QUE MODULAM PROLIFERAÇÃO DEPENDENTE DE c-Met

Os anticorpos específicos para c-Met diferentes resultantes selecionados da biblioteca HuCAL GOLD® são depois convertidos no formato de IgG e testados para potência para inibir proliferação dirigida por HGF.

A atividade funcional de cada um dos clones selecionados é avaliada usando um ensaio de incorporação de BrdU sob estimulação de HGF de células 4MBr-5. Células 4MBr-5 são colocadas em placa a uma densidade de 3×10^3 células por poço em um volume total de 100 µl/poço Ham's F12K suplementado com 10 % FBS em placas tratadas com cultura de tecido de fundo chato de 96 poços (Costar, #3610). As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO_2 durante 2 h após as quais são adicionados 50 µl de meio contendo o anticorpo purificado a ser testado. Como um controle negativo por falta de modulação, uma amostra de um an-

ticorpo não relacionado (tendo uma especificidade conhecida não relaciona-
 da aos determinantes de epítipo de c-Met), ou tampão, é adicionada aos
 poços designados. As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5
 % CO₂ durante 1 h após as quais, 50 µl do meio sozinho ou 50 µl de HGF
 5 contendo (por exemplo, cerca de 0,5 µg/µl a cerca de 50 ng/ml) são adicio-
 nados. As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂ du-
 rante 72 h após as quais incorporação de BrDU é ensaiada usando o ELISA
 de proliferação de célula, ensaio de BrdU (Roche) No de Cat. 1 669 915.
 Brevemente, 20 µl/poço de solução de BrdU (#1) são adicionados e as pla-
 10 cas incubadas por 22 h a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂. Meio é sua-
 vemente removido e a placa secada durante 1 h a 60° C. 200 µl de FixDenat
 (solução #2) são adicionados e as placas incubadas em temperatura ambi-
 ente com agitação suave durante 30 minutos. A solução é suavemente re-
 movida e 100 µl/poço solução de trabalho de anti-BrDU adicionada. As pla-
 15 cas são incubadas em temperatura ambiente com agitação suave durante 90
 minutos. A solução é suavemente removida e os poços lavados três vezes
 com 250 µl de solução de lavagem. A solução é suavemente removida e 100
 µl/poço de solução de substrato adicionados, as placas são medidas a
 A405nm.

20 DETERMINAÇÃO DE EC₅₀

Os dados que mostram a concentração eficaz para 50 % de ini-
 bição de proliferação estimulada por HGF para os clones de anticorpos ten-
 do a maior afinidade para c-Met estão mostrados na Tabela 3 aqui. Os da-
 dos mostram que concentrações eficazes de EC₅₀ variam de 4 nM, com um
 25 valor mediano entre 6 e 150 nM.

IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS DE c-Met ANTI-HUMANO DE IgG QUE MODULAM MIGRAÇÃO DEPENDENTE DE c-Met

Migração celular em resposta à estimulação com HGF é ensaia-
 da usando células NCI-H441 no ensaio de migração celular de quimiotaxia
 30 de 8 µM de 96 poços de QCM™. Como descrito acima, 24 h antes do ensaio
 as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e privadas no DMEM
 contendo 1 % FBS a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂. Subseqüente-

mente, as células são tripsinadas e re-suspensas a $1,0 \times 10^6$ células por ml na presença de concentração apropriada do anticorpo purificado por 30min a 37°C . Como um controle negativo por falta de modulação, uma amostra de um anticorpo não relacionado (tendo uma especificidade conhecida não relacionada aos determinantes de epítipo de c-Met), ou tampão, é adicionada aos poços designados.

Sob condições estéreis a tampa da placa de câmara de migração é removida e 150 μl de meios livres de soro contendo 50 ng/ml de HGF (R&D No de Cat. 294-HGN) são adicionados aos poços da bandeja alimentadora (câmara inferior). 100 μl de $5-10 \times 10^4$ células em DMEM com 1 % FBS pré-incubado com anticorpo são adicionados suavemente à câmara superior. A placa é coberta e incubada durante 16 horas a 37°C entre 4-6 % CO_2 . Seguindo as instruções dos fabricantes, as células/meios na câmara superior são descartados e a câmara colocada em uma Bandeja Alimentadora de 96 poços à qual 150 μL /poço de solução de separação de célula pré-aquecida foram adicionados. Células são desalojadas incubando durante 30 minutos a 37°C com agitação suave periódica. Subseqüentemente, 50 μl de tintura de CyQuant GR pré-diluída são adicionados a cada poço da bandeja alimentadora. A placa é incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente e 150 μl da mistura transferidos para uma placa de 96 poços nova adequada para medição de fluorescência usando um conjunto de filtro de 480/520 nm.

Os dados que mostram a concentração eficaz para 50 % inibição de migração estimulada por HGF para os clones de anticorpos tendo a maior afinidade para c-Met estão mostrados na Tabela 3 aqui. Os dados mostram que concentrações eficazes de EC_{50} variam de 0,14 nM, com um valor mediano entre 0,27 e 0,61 nM.

TABELA 3. CONCENTRAÇÃO EFICAZ PARA 50 % DE INIBIÇÃO DE Fabs SELECIONADOS

Fab	EC ₅₀ [nM] Inibição de proliferação dirigida por HGF 4MBr-5	EC ₅₀ [nM] Inibição de migração dirigida por HGF NCI-H441
4536	4	0,61
4537	150	0,14
4541	200	0,27
4687	6	1.68

EXEMPLO 5: MATURAÇÃO DE AFINIDADE DE Fabs DE ANTI-c-Met SELECIONADOS PARA PERMUTA PARALELA DE CASSETES DE LCDR3 E HCDR2

Para otimizar as afinidades dos anticorpos descritos aqui para c-Met para um fundo geral de fragmentos de Fab parentais, o LCDR3, estrutura 4 e a região constante das cadeias leve (405 bp) de cada Fab parental é removida usando *Bpi*I e *Sph*I, e é substituída por um repertório de LCDR3s diversificados junto com estrutura 4 e o domínio constante. Uma amostra de 0,5 µg do vetor de fundo geral de aglutinante é ligada com um excesso molar de 3 vezes do fragmento inserido portando os LCDR3s diversificados.

Em um método similar, o HCDR2 é diversificado usando os sítios de *Xho*I e *Bss*HI, e as regiões de estrutura de conexão são mantidas constantes. Para aumentar a eficiência da clonagem, o HCDR2 parental é substituído por uma sequência de enchimento de 590 bp antes da inserção do cassete de HCDR2 diversificado.

Misturas de ligação de bibliotecas diferentes são eletroporadas em 4 ml de células de TOP10 F' de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), rendendo de 2×10^7 a 2×10^8 colônias independentes. Amplificação das bibliotecas é previamente executada como descrito (Rauchenberger et al., 2003 J Biol Chem. 278(40):38194-38205). Para controle de qualidade, vários clones por biblioteca são escolhidos fortuitamente e seqüenciados (SequiServe,

Vaterstetten, Alemanha) usando preparadores CFR84 (V_L) e OCAL_Seq_Hp (V_H).

SELEÇÃO DE CANDIDATOS PARA MATURAÇÃO DE AFINIDADE

- Seis candidatos de maturação selecionados ("Fabs parentais") são selecionados usando as propriedades a seguir: afinidades para c-Met humano menos que 10 nM, com reatividade cruzada significativa para c-Met cinomólogo, EC_{50} menos que 250 nM, e níveis de expressão de Fabs moderados em *E. coli* e atividade no formato de IgG em proliferação dirigida por c-Met e ensaios de migração. As propriedades de fragmentos de Fab selecionados são fornecidas na Tabela 4.

TABELA 4. PROPRIEDADES DOS Fabs SELECIONADOS

Anticorpo	K_D [nM] c-Met humano BIAcore	K_D [nM] c-Met humano GTL-16	K_D [nM] c-Met cino CHO-c- Met cino	Expressão de FAB [mg/l]	EC_{50} [nM] IgG de proli- feração de 4Mbr-5	EC_{50} [nM] Migração de IgG de NCI-H441
4536	1,4	1,7	229,1	6,3	4	0,61
4537	1,7	1,5	12,7	7,4	150	0,14
4541	2,6	1,7	0,6	5,3	200	0,27
4687	0,8	4,0	1,3	1,4	6	1,68

GERAÇÃO DE BIBLIOTECAS DE FAB SELECIONADAS PARA MATURAÇÃO DE AFINIDADE

- A fim de obter clones tendo atividade aumentada de afinidade e inibidor dos anticorpos de anti-c-Met, os clones de Fab selecionados mostrados no exemplo anterior são submetidos a outros ciclos de diversificação e seleção, um processo conhecido como maturação de afinidade. Para este propósito, as regiões de CDR são diversificadas usando cassetes de maturação de LCDR3 e HCDR2 correspondentes pré-construídos por mutagênese de trinucleotídeo (Virnekäs et al., 1994 Nucleic Acids Res. 22:5600-5607; Nagy et al., 2002 Nature Medicine 8:801-807).

Fragmentos de Fab do vetor de expressão pMOR-

PH®X9_Fab_FH são subclonados no vetor de fagemídeo pMORPH®25 (vide número patente U. S. 6.753.136). Este vetor fornece a proteína de fago pIII de N-terminalmente fundida em um resíduo de cisteína como também uma cisteína C-terminal para a cadeia de anticorpo Fd e desse modo permite exibição ligada a dissulfeto dos respectivos fragmentos de Fab na superfície de fago. Duas estratégias diferentes são aplicadas em paralelo para otimizar a afinidade e a eficácia dos Fabs parentais.

Cinco bibliotecas de Fab de anticorpo de fago são geradas em que o LCDR3 de cinco dos seis clones parentais é substituído por um repertório de seqüências de CDR3 de cadeia leve individuais. (A maturação de LCDR3 de um clone não é executada, como este clone tem um sítio de restrição de *BpI* adicional em uma das regiões de CDR e a enzima de restrição de *BpI* é usada para o procedimento de clonagem de biblioteca).

Em paralelo, a região de HCDR2 de cada clone parental é substituída por um repertório de seqüências de CDR2 de cadeia pesada individuais. Cada Fab parental é excisado e substituído por um enchedor de 590 bp. Este enchedor de DNA facilita a separação de bandas de vetor digerido simples de digerido duplo e reduz a base dos Fabs de alta afinidade parentais durante os *pannings* de maturação. Em uma etapa subsequente, o enchedor é excisado dos plasmídeos de codificação de Fab de cada clone parental e substituído para o cassete de maturação de HCDR2 altamente diversificado.

Bibliotecas de maturação de afinidade grande de mais de 2×10^7 membros são geradas através de procedimentos de clonagem padrões, e os clones diversificados são transformados em células de TOP10F' de *E. coli* eletrocompetentes (Invitrogen). Fagos de apresentação de FAB são preparados como descritos acima.

Fundo gerais de maturação são construídos para facilitar o processo de seleção subsequente:

Fundo geral 1a consistiu nas bibliotecas de LCDR3-1; fundo geral 1b consistiu nas bibliotecas de HCDR2-1; fundo geral 2a consistiu nas bibliotecas de LCDR3-2; e fundo geral 2b consistiu nas bibliotecas de HCDR2-2.

Para cada fundo geral o *panning* é executado em solução usando quantidades decrescentes de c-Met marcado com His-Strep e captura de antígeno de fago através de contas de Strep-Tactin. Em paralelo, cada fundo geral é aplicado em *pannings* usando quantidades decrescentes de c-Met biotinilado que é capturado sobre placas revestidas com Neutravidin. A fim de aumentar a severidade de *panning* e selecionar as taxas melhoradas, competição com Fabs parentais purificados como também antígeno não-marcado é executada durante períodos de incubação prolongados.

10 Imediatamente após *panning* os fundos gerais de fagemídeo enriquecidos são subclonados no vetor de expressão de pMORPH@X9_FH. Clones simples são escolhidos, e expressão de genes nos Fabs é induzida com IPTG.

ESTRATÉGIAS DE MATURAÇÃO DE *PANNING*

15 Procedimentos de *panning* usando os quatro fundos gerais de anticorpo são executados com c-Met marcado com His-Strep e com c-Met marcado com His-Strep biotinilado em solução para dois ou três ciclos, respectivamente. Para cada uma das estratégias de *panning*, competição com as proteínas purificadas de Fab parental ou com c-Met marcado com APP não-marcado, como também baixas concentrações de antígeno e lavagem
20 extensiva, são usadas para aumentar a severidade.

O *panning* da solução em c-Met marcado com His-Strep não-marcado é executado mais de dois ciclos de seleção principalmente de acordo com o protocolo padrão descrito no Exemplo 1. Exceções para estes procedimentos são a aplicação de quantidades reduzidas de antígeno (diminuindo de 5 nM até 1 nM), a severidade alta do procedimento de lavagem ou
25 com ou sem competidor, e períodos de incubação prolongados de fagos de anticorpo junto com o antígeno.

Para o primeiro ciclo de seleção usando c-Met biotinilado, os poços de uma placa de Neutravidin são lavados duas vezes com 300 µl de
30 PBS. Os poços são bloqueados com 2x ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA) diluídos 1:1 em PBS (Tampão de Bloqueio). Antes das seleções, os fagos de HuCAL GOLD® são também bloqueados com um volume

de Tampão de Bloqueio contendo 0,1 % Tween-20 durante 30 min em temperatura ambiente. As preparações de fago bloqueadas são transferidas em alíquotas de 100 µl para os poços de uma placa revestida com Neutravidin durante 30 min em temperatura ambiente. Esta etapa de pré-adsorção é repetida uma vez. Preparações de fago bloqueadas e pré-clareadas são incubadas com 5 nM c-Met biotinizado por 2 h a 22° C em uma roda giratória. Uma amostra contendo Fab parental e APP-c-Met, ou um controle positivo não contendo nenhum competidor, é adicionada e as amostras são incubadas durante a noite a 4° C em uma roda giratória.

10 Complexos de antígeno-fago são capturados nos poços de uma placa de Neutravidin por 20 min em temperatura ambiente. Após etapas de lavagem extensivas, partículas de fago ligadas são eluídas por adição de 200 µl de 20 mM DTT em 10 mM Tris pH 8,0 por poço durante 10 min em temperatura ambiente. O eluato é removido e adicionado a 14 ml de células de TG1 de *E. coli* crescidas a uma OD_{600nm} de 0,6-0,8. Os poços são enxaguados uma vez com 200 µl de PBS e esta solução é também adicionada às células de TG1 de *E. coli*. Infecção de fago de *E. coli* é permitida por 45 min a 37° C sem agitação. Após centrifugação por 10 min a 5000 rpm, as pelotas bacterianas foram re-suspensas em 500 µl de meio 2xYT, colocadas sobre placas de ágar 2xYT-CG e incubadas durante a noite a 30° C. As colônias são colhidas raspando da superfície das placas e as partículas de fago são salvas e amplificadas como descrito acima.

20 O segundo e terceiro ciclo da seleção são executados como descrito acima para o primeiro ciclo de seleção, exceto que as condições de lavagem são mais rigorosas e concentrações de antígeno são 1 e 0,1 nM, respectivamente.

ANÁLISE DE LIGAÇÃO COM BASE EM ELETROQUIMIOLUMINESCÊNCIA (BIOVERIS) DE Fabs DE LIGAÇÃO DE c-Met

30 Para a detecção de afinidade melhorada, fragmentos de anticorpos específicos para c-Met em lisados de *E. coli* (Extratos de BEL), uma Estação de Trabalho BioVeris M-384 SERIES® (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK), é usada. O ensaio é realizado em placas de microtitulação de

polipropileno de 96 poços e PBS suplementado com 0,5 % BSA e 0,02 % Tween-20 como o tampão de ensaio. c-Met humano biotinilado é imobilizado em contas paramagnéticas de M-280 Streptavidin (Dyna) de acordo com as instruções do provedor. Uma diluição 1:25 da solução de matéria-prima de
 5 conta é adicionada por poço. Amostras de 100 µl de extrato de BEL diluído e contas são incubadas durante a noite em temperatura ambiente em um agitador. Para detecção, (Fab)'₂ anti-humano (Dianova) marcado com BV-tag™ de acordo com instruções do provedor (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) é usado.

10 Um conjunto de clones fortuitamente escolhidos é analisado pelo método descrito acima. Um subconjunto daqueles clones que dão os valores mais altos é escolhido para análise adicional na titulação de equilíbrio de solução.

15 DETERMINAÇÃO DAS AFINIDADES EM PICOMOLAR USANDO TITULAÇÃO DE EQUILÍBRIO DE SOLUÇÃO (SET)

Para determinação de K_D, frações de monômero (pelo menos 90 % de conteúdo de monômero, analisado por SEG analítica; Superdex75, Amersham Pharmacia) de Fab são usadas. Determinação da afinidade com base em eletroquimioluminescência (ECL) na solução e avaliação dos dados
 20 é executada basicamente como descrito por Haenel et al., 2005. Uma quantidade constante de Fab é equilibrada com concentrações diferentes (3n diluições seriais) de c-Met humano (4 nM de concentração de partida) na solução. c-Met humano biotinilado acoplado às contas paramagnéticas (M-280 Streptavidin, Dynal), e (Fab)'₂ anti-humano marcado com BV-tag™ (BioVeris
 25 Europe, Witney, Oxfordshire, UK) (Dianova) é adicionado e a mistura incubada durante 30 min. Subseqüentemente, a concentração de Fab não-ligado é quantificada por detecção de ECL usando o analisador M-SERIES® 384 (BioVeris Europe).

30 Para este propósito, clones simples são selecionados e purificados por Ni-NTA Agarose na escala de µg. Afinidades preliminares são determinadas através de titulação de equilíbrio de solução de 4 pontos (SET) em BioVeris. Destes dados, afinidades de exibição de clones são seleciona-

das. Estes Fabs são purificados na escala de mg. Afinidades finais são determinadas de duas bateladas independentes de cada Fab clone usando uma medição de SET de 8 pontos e c-Met humano, camundongo, e cinomólogo.

- 5 Determinação da afinidade para c-Met de camundongo e cinomólogo é feita essencialmente como descrito acima usando c-Met de camundongo (R&D Systems) e c-Met cinomólogo como analito em solução em vez de c-Met humano. Para detecção de Fab livre, c-Met humano biotilado acoplado às contas paramagnéticas é usado. As afinidades são calculadas de acordo com métodos conhecidos àqueles versados na técnica, por exemplo, Haenel et al., 2005 Anal Biochem 339.1:182-184.

- Usando as condições de ensaio descritas acima, as afinidades para os Fabs anti-c-Met otimizados na afinidade são determinadas na solução. Afinidades são determinadas para anticorpos com K_D s abaixo de 4,6 pM para c-Met humano. Análise com base em FACs de ligação a c-Met cino expresso em células CHO, como descrito acima, é realizada. As afinidades estão resumidas na Tabela 5 aqui.

TABELA 5. AFINIDADES DE Fabs

	Afinidade [pM]: titulação de equilíbrio da solução	K_D [pM] c-Met cino CHO-c-Met cino
Anticorpo	c-Met humano	c-Met cino
5091	$2,4 \pm 0,5$	90
5097	$3,6 \pm 0,9$	0,68
5098	$2,1 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,1$
5185	$4,6 \pm 3,9$	0,29

20 EXEMPLO 6: CARACTERIZAÇÃO DE Fabs DE c-Met ANTI-HUMANO OTIMIZADOS NA AFINIDADE

TÉCNICAS DE SATURAÇÃO DE FACS

- Especificidade de ligação dos Fabs maduros na presença de 50 % de soro humano (HS) é determinada. Diluições seriais de Fabs de anti-cMet otimizados são incubadas na presença de 50 % de soro humano ou na

presença de 2,8 % de BSA. Ligação de saturação de FACS às células de GTL-16 é avaliada. células de GTL16 são lavadas, tripsinadas, e suspensas em PBS contendo 3 % FCS (3 % FCS/PBS) a 4º C. $2-5 \times 10^5$ células/amostra são re-suspensas em 140 µl de 3 % FCS//PBS contendo 5 µg/ml de Fabs de anti-cMet otimizados purificados ou diluições seriais dos mesmos. Como um controle positivo 5 µg/ml de DO24 (IgG2a de camundongo), c-Met anti-humano é usado. As células são incubadas durante 30-60 minutos a 4º C antes de ser empelotadas através de centrifugação por 2 min a 2000 rpm (716 g) a 4º C e lavadas em 200 µl de 3 % FCS/PBS frio. As células são novamente empelotadas por centrifugação e o PBS suavemente removido. Células são re-suspensas em 100 µl de IgG anti-humana de cabra (H+L) conjugado com PE (Jackson No de Cat. 109-116-088) diluídas 1:200 em 3 % FCS/PBS; Para controle positivo, IgG de anti-camundongo de cabra (H+L) conjugado com PE (Jackson No de Cat. 115-116-146) diluído a 1:200 em 3 % FCS/PBS é usado. Amostras são incubadas na escuridão por 30-60 min a 4º C. Seguindo centrifugação e lavagem em 200 µl de 3 % FCS/PBS as células são re-suspensas em 100 µl de 3 % FCS/PBS e ensaiadas usando arranjo de FACS ou FACS-Calibur.

Curvas de ligação exemplares estão mostradas na Tabela 6 que resume a atividade de ligação dos Fabs de anti-c-Met otimizados na presença de 50 % de soro humano comparada à atividade de ligação em 2,8 % BSA variando de 83,3 % a 100 %. O valor mediano é observado ser 90,2 %, desse modo os Fabs de anti-c-Met são observados completamente ligar ao alvo na presença de soro humano.

TABELA 6. ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DE Fabs

Anticorpo	Atividade de ligação c / 50 % soro humano vs 2,8 % BSA (%)
5091	83,8
5097	90,2
5098	100
5185	*

* LIGAÇÃO DE 5185 NÃO ANALISADA AINDA EM TERMOS DE EC_{50} UMA

VEZ QUE SATURAÇÃO NÃO É ALCANÇADA

CONVERSÃO DE ANTI-CMET OTIMIZADO CANDIDATO FABS NO FORMATO DE IgG

Dimerização mediada por anticorpo pode resultar em ativação agonística da atividade de c-Met de tirosina cinase. Portanto, Fabs otimizados selecionados na base de c-Met purificado de ligação, são convertidos no formato de IgG. Para expressar imunoglobulina de comprimento total (Ig), fragmentos de domínios variáveis de cadeias pesadas (V_H) e leves (V_L) são subclonados na série dos vetores de expressão de Fab pMORPH®X9_FH ou pMORPH®_h_Ig do vetor de pMORPH®2_h_Ig para IgG1 humana e IgG4 humana. Enzimas de restrição *EcoRI*, *MfeI*, e *BlnI* são usadas para subclonagem do fragmento de domínio de V_H em pMORPH®_h_IgG1 e pMORPH®_h_IgG4. Enzimas de restrição *MfeI* e *BlnI* são usadas para subclonagem do fragmento de domínio de V_H em pMORPH®2_h_IgG1f e pMORPH®2_h_IgG4. Subclonagem do fragmento de domínio de V_L em pMORPH®_h_Igk e pMORPH®2_h_Igk é executada usando os sítios de *EcoRV* e *BsWI*, enquanto que subclonagem em pMORPH®_h_Igy e pMORPH®2_h_Igy2 é feita usando *EcoRV* e *HpaI*.

EXPRESSÃO TRANSIENTE E PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA

Células de HEK293 são transfeccionadas com uma quantidade equimolar de vetores expressão de IgG de cadeia pesada e leve. Nos dias 4 ou 5 após transfecção, o sobrenadante de cultura de célula é colhido. Após ajustar o pH do sobrenadante para 8,0 e filtração estéril, a solução é submetida à cromatografia de coluna de proteína A padrão (Poros 20A, Biosystems PE).

IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS DE c-Met ANTI-HUMANO OTIMIZADOS DE IgG MODULANDO PROLIFERAÇÃO DEPENDENTE DE c-Met

Os anticorpos c-Met-específicos otimizados resultantes selecionados da biblioteca HuCAL GOLD® são depois convertidos no formato de IgG e testados para potência para inibir proliferação dirigida por HGF.

A atividade funcional de cada um dos clones selecionados é avaliada usando um ensaio de incorporação de BrdU sob estimulação de

HGF de células 4MBr⁻⁵. Células 4MBr⁻⁵ são colocadas em placa a uma densidade de 3×10^3 células por poço em um volume total de 100 µl/poço de Ham's F12K suplementado com 10 % de FBS em placas tratadas com cultura de tecido de fundo chato de 96 poços (Costar, #3610). As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂ durante 2 h após as quais são adicionados 50 µl de meio contendo o anticorpo purificado a ser testado. Como um controle negativo por falta de modulação, uma amostra de um anticorpo não relacionado (tendo uma especificidade conhecida não relacionada aos determinantes de epítipo de c-Met), ou tampão, é adicionada aos poços designados. As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂ durante 1 h após as quais, 50 µl do meio sozinho ou 50 µl contendo HGF (por exemplo, cerca de 0,5 µg/µl a cerca de 50 ng/ml) são adicionados. As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂ durante 72 h após as quais incorporação de BrDU é ensaiada usando o ELISA de proliferação celular, ensaio de BrdU (Roche) No de Cat. 1 669 915. Brevemente, 20 µl/poço de solução de BrdU (#1) são adicionados e as placas incubadas durante 22 h a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂. Meio é suavemente removido e a placa secada durante 1 h a 60° C. 200 µl de FixDenat (solução #2) são adicionados e as placas incubadas em temperatura ambiente com agitação suave durante 30 minutos. A solução é suavemente removida e 100 µl/poço de solução de trabalho de anti-BrDU adicionados. As placas são incubadas em temperatura ambiente com agitação suave durante 90 minutos. A solução é suavemente removida e os poços lavados três vezes com 250 µl de solução de lavagem. A solução é suavemente removida e 100 µl/poço de solução de substrato adicionados, as placas são medidas a A405nm.

DETERMINAÇÃO DE EC₅₀

Os dados que mostram a concentração eficaz para 50 % de inibição de proliferação estimulada de HGF para os clones de anticorpos tendo a maior afinidade para c-Met estão mostrados na Tabela 7 aqui. Os dados mostram que concentrações eficazes EC₅₀ variam de 0,13 nM, com um valor mediano entre 0,5 nM e 1,3 nM.

TABELA 7. ATIVIDADE INIBIDORA DE CANDIDATOS DE ANTI-c-Met OTIMIZADOS NA FORMAÇÃO DE IgG EM PROLIFERAÇÃO ESTIMULADA POR HGF

Anticorpo	EC ₅₀ [nM] Inibição de proliferação dirigida por HGF 4MBr-5 entre 10 % soro
5091	1,3
5097	1,6
5098	0,5
5185	0,13

5 TÉCNICAS DE ENSAIO IMUNOABSORVENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)

Especificidade de ligação dos Fabs maduros na presença de 50 % de soro humano (HS) é determinada. Diluições seriais de anticorpo biotiniado humano recombinante, em TBS são revestidas sobre placas de microtitulação de Neutravidin por 2 h em temperatura ambiente, de 8 ng de anticorpo por poço para uma concentração de 125 ng de anticorpo por poço. Após revestimento do antígeno, os poços são bloqueados com TBS / 0,05 % Tween (TBS-T) suplementados com 1 % BSA por 1 h em temperatura ambiente. Fabs purificados descritos acima são diluídos em TBS / 4 % BSA ou TBS / 50 % HS a uma concentração final de 1 µg/ml, adicionados aos poços revestidos e bloqueados e as placas são incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Para detecção, um anticorpo anti-flag de fosfatase alcalina conjugado com (AP) (diluição de 1:5000 em TBST) e o substrato de AttoPhos fluorogênico (Roche) é usado. Após cada incubação, os poços das placas de microtitulação são lavados cinco vezes com TBST, exceto após a etapa de incubação final com o anticorpo secundário marcado quando os poços são lavados três vezes. A fluorescência é medida em uma leitora de placa TECAN a Spectrafluor.

IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS DE IgG DE c-Met ANTI-HUMANO QUE MODULAM MIGRAÇÃO DEPENDENTE DE c-Met

Migração celular em resposta à estimulação com HGF é ensaiada usando células de NCI-H441 no ensaio de migração celular de quimiotaxia de 8 μ M de 96 poços de QCM™. Como descrito acima, 24 h antes do ensaio, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e privadas no DMEM contendo 1 % FBS a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO₂. Subseqüentemente, as células são tripsinadas e re-suspensas a $1,0 \times 10^6$ células por ml na presença de concentração apropriada do anticorpo purificado por 30 min a 37° C. Como um controle negativo por falta de modulação, uma amostra de um anticorpo não relacionado (tendo uma especificidade conhecida não relacionada aos determinantes de epítipo de c-Met), ou tampão, é adicionada aos poços designados.

Sob condições estéreis a tampa da placa de câmara de migração é removida e 150 μ l de meios livres de soro contendo 50 ng/ml HGF (R&D No de Cat. 294-HGN) são adicionados aos poços da bandeja alimentadora (câmara inferior). 100 μ l de $5-10 \times 10^4$ células em DMEM com 1 % FBS pré-incubado com anticorpo são adicionados suavemente à câmara superior. A placa é coberta e incubada durante 16 horas a 37° C entre 4-6 % de CO₂. Seguindo as instruções dos fabricantes, as células/meios na câmara superior são descartados e a câmara colocada em uma Bandeja Alimentadora de 96 poços à qual 150 μ L/poço de solução de separação de célula pré-aquecida foram adicionados. Células são desalojadas incubando durante 30 minutos a 37° C com agitação suave periódica. Subseqüentemente, 50 μ l de tintura de CyQuant GR pré-diluída são adicionados a cada poço da bandeja alimentadora. A placa é incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente e 150 μ l da mistura transferidos para uma placa de 96 poços nova adequada para medição de fluorescência usando um conjunto de filtro de 480/520 nm.

Os dados que mostram a concentração eficaz para 50 % de inibição de migração estimulada por HGF para os clones de anticorpos tendo a maior afinidade para c-Met estão mostrados na Tabela 8 aqui. Os dados

mostram que concentrações eficazes de EC_{50} variam de 0,61 nM, com um valor mediano entre 0,73 nM e 0,76 nM.

Tabela 8. ATIVIDADE INIBIDORA DE CANDIDATOS anti-c-Met OTIMIZADOS NA FORMAÇÃO DE IgG SOB MIGRAÇÃO ESTIMULADA DE HGF

Anticorpo	EC_{50} [nM] Inibição de migração dirigida por HGF NCI-H441 em 1 % soro
5091	$0,61 \pm 0,22$
5097	$0,76 \pm 0,69$
5098	$0,73 \pm 1,1$
5185	$1,2 \pm 1,3$

5

EXEMPLO 7: MODULAÇÃO DE HGF STIMULATED c-Met AUTOFOSFORILAÇÃO POR SELECIONADO ANTAGONÍSTICO ANTICORPOS DE ANTI-c-Met

Agonismo ou antagonismo por anticorpos de anti-c-Met da invenção é medido por ativação ou inibição de fosforilação de c-Met em células com e sem estimulação com HGF. Células de uma linhagem celular tais como células de A549 são colocadas em placa a uma densidade de 3×10^4 células por poço em um volume total de 100 μ l/poço de DMEM suplementado com 10 % FBS em placas tratadas com cultura de tecido de fundo chato de 96 poços (Costar, #3595). As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO_2 durante 24 h após as quais o meio é aspirado suavemente de cada poço das placas e um volume de 100 μ l/poço de DMEM adicionado. As placas são incubadas a 37° C em uma atmosfera de 5 % CO_2 durante 24 h após as quais uma amostra de um anticorpo purificada é testada, 100 μ l por poço do anticorpo ou uma diluição, são adicionados às células no poço diluído em DMEM. Como um controle negativo por falta de ativação, uma amostra de um anticorpo não relacionado (tendo uma especificidade conhecida não relacionada aos determinantes de epítipo de c-Met), ou também, é adicionada aos poços designados.

As células são incubadas a 37° C durante um período de tempo curto (por exemplo, 2 horas) ou um período de tempo mais longo (por exemplo, 24 horas). Onde apropriado, as células são estimuladas pela adição de HGF em meios de DMEM livres de soro a uma concentração final de 200 ng/poço. Em geral, quando ensaiar a atividade agonística dos anticorpos, com exceção do controle positivo (não tratado com anticorpo), HGF é omitido dos poços de anticorpo de amostra de teste. Em geral, quando ensaiar a atividade antagonística dos anticorpos, HGF é incluído nos poços de anticorpo de amostra de teste. As placas são também incubadas por 10 min a 37° C, depois o meio é aspirado suavemente dos poços das placas. As células são lavadas com PBS frio contendo e a solução é aspirada suavemente das placas. As células são lisadas com 50 µl de tampão de lise (tampão de lise NP-40: 120 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1 % de NP-40, 1 mM de EDTA, 6 mM de EGTA, 20 mM de NaF, 1 mM de Benzamidina com 0,5 mM de Na₃VO₄ recentemente adicionado, e 0,1 mM de PMSF). As placas são agitadas em temperatura ambiente durante 15 minutos, e são depois armazenados em -80° C até necessário para ELISA.

Um ELISA é usado para determinar os níveis de fosforilação de c-Met. Para preparação de placa ELISA, Placa de Nunc-Imuno™, Superfície de MaxiSorb™ (VWR AG Internacional, N°391-8786) são lavadas duas vezes com tampão de lavagem (PBS-0,05 % Tween Biorad #670-6531), e 100 µl de anticorpo monoclonal de captura de c-Met (DO-24) em PBS são adicionados. As placas são incubadas durante a noite a 4° C três vezes lavadas com PBS-0,05 % Tween. Sítios de ligação não-específicos são bloqueados com 200 µl/poço de 3 % BSA em PBS-T durante 2 horas em temperatura ambiente, com agitação. Imediatamente antes do uso a solução de bloqueio é removida.

Lisados de célula congelados são fundidos agitando em temperatura ambiente e 40 µl de lisado são adicionados às placas de Nunc-Imuno e as placas são incubadas a 4° C durante 4 horas. As placas são lavadas três vezes com PBS-T, e 50 µl/poço de 0,2 µg/ml de anticorpo de anti-fosfotirosina PY20-HRP (ZYMED, #03-7722) em 3 % de albumina de soro

bovino-PBS-T. As placas são incubadas durante a noite a 4° C. e três vezes lavadas com PBS-T. O PBS-T é aspirado e 90 µl / poço de substrato de fosfatase alcalina (CDR-Star, TROPIX, #MS100RY) adicionados e desenvolvidos enquanto agitando suavemente por 45 min em temperatura ambiente.

- 5 As placas são lidas usando uma leitora de placa de 96 poços.

Os dados que mostram a concentração eficaz para 50 % de inibição de migração estimulada por HGF para os clones de anticorpos tendo a maior afinidade para c-Met são mostrados na Tabela 9 aqui. Os dados mostram que concentrações eficazes de EC₅₀ variam de 0,166 nM, com um valor

- 10 mediano entre 0,193 e 0,219 nM.

TABELA 9. ATIVIDADE INIBIDORA DE CANDIDATOS DE anti-c-Met OTIMIZADOS NA FORMAÇÃO DE IgG EM AUTOFOSFORILAÇÃO DE RECEPTOR ESTIMULADO COM HGF

Anticorpo	EC ₅₀ [nM] Inibição de autofosforilação de c-Met estimulada com HGF em A549
5091	0,193
5097	0,166
5098	0,419
5185	0,219

15 EXEMPLO 8: SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDO E SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEO DE GENES OTIMIZARAM PARA EXPRESSÃO

Para aumentar expressão mamífera, alterações são introduzidas nas cadeias pesadas e leves de Fabs aqui para otimização de uso de códon para expressão em uma célula mamífera. É conhecido que vários motivos de ação negativa cis diminuem a expressão em mamíferos. O processo de

20 otimização aqui remove os sítios de ação negativa cis (tais como sítios de *splice* ou sinais poly(A)) que negativamente influenciam a expressão. O processo de otimização aqui também enriquece o conteúdo de GC, para prolongar a meia-vida do mRNA.

Regiões variáveis de cadeia leve e pesada são otimizadas usando um clone de um Fab e isolado através de seleção com exibição de

25

fago. Depois as seqüências de nucleotídeo que codificam cada uma das cadeias leves e pesadas inteiras deste e outros clones são cada uma otimizadas usando estes procedimentos.

PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO PARA CADEIAS DE V_H E V_L

5 Para otimizar a seqüência de nucleotídeo e seqüência de aminoácido de cada uma das cadeias de V_L e V_H , o uso de códon é adaptado à impulsão de códon de genes mamíferos, especialmente *H. sapiens*. Além disso, regiões de conteúdo de GC muito alto (> 80 %) ou muito baixo (< 30 %) são reduzidas ou eliminadas onde possível.

10 Durante o processo de otimização, os motivos de seqüência de ação cis a seguir são evitados: caixa TATA interna, chi-sítios e sítios de entrada ribossômica, extensões de seqüência rica em AT ou rica em GC, elementos de seqüência de motivo de instabilidade do RNA (ARE), elementos inibidores de seqüência de RNA (INS), elementos de seqüência responsivo a
15 cAMP (CRS), seqüências repetidas e estruturas secundárias de RNA, sítios doadores e aceitantes de *splice* incluindo sítios secretos, e pontos de ramificação. Exceto como indicado, a introdução de sítios de *MluI* e *HindIII* é evitada no processo de otimizar a seqüência de nucleotídeo da cadeia de V_L . Exceto como indicado, a introdução de sítios de *MlyI* e *BstEII* é evitada no
20 processo de otimizar a seqüência de nucleotídeo da cadeia de V_H .

SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDO DE CADEIAS V_H E V_L OTIMIZADAS PARA EXPRESSÃO

Uso de códon é adaptado aos dos Mamíferos descritos para permitir taxas de expressão mais altas e mais estáveis em uma célula mamí-
25 fera para as seqüências de aminoácido otimizadas resultando nas cadeias de V_H e V_L do clone acima.

Histogramas podem ser usados para mostrar as porcentagens de códons de seqüência para cada uma das seqüências parentais e genes otimizados respectivamente, e analisa a classe de qualidade das seqüências
30 de nucleotídeo respeitáveis que codificam as cadeias de V_H e V_L . Valor de qualidade como aqui usado significa que o códon mais freqüente usado para um aminoácido dado no sistema de expressão desejado é fixo como 100, e

os códons restantes são escalados de acordo com a frequência de uso. (Sharp, P. M., Li, W. H., *Nucleic Acids Res.* 15 (3), 1987).

5 Também, o índice de adaptação de códon (CAI) é um número que descreve quão bem os códons da sequência de nucleotídeo equiparam com a preferência de uso de códon do organismo alvo. O valor máximo de CAI é ajustado para 1,0, desse modo um CAI de $> 0,9$ é considerado como permitindo expressão alta. O CAI para a cadeia de V_L antes da otimização é observado ser 0,73, e após otimização, o CAI é determinado ser 0,95. Simi-

10 0,74, e após otimização, é determinado ser 0,98.

O conteúdo de GC na cadeia de V_L da sequência de origem é aumentado para a sequência otimizada.

OTIMIZAÇÃO PARA EXPRESSÃO DE CADEIAS LEVES E CADEIAS PESADAS DE COMPRIMENTO TOTAL

15 O processo de otimização é aplicado a cada uma das seqüências de nucleotídeo de comprimento total de origem das cadeias leve e as seqüências de nucleotídeo de comprimento total de origem das cadeias pesadas.

20 O processo de otimização é usado para a construção das seqüências de nucleotídeo de cadeia leve associadas aos números de clone de origem. Também, o processo de otimização é usado para a construção das seqüências de nucleotídeo de cadeia pesada associadas aos números de clone de origem.

TABELA E. LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS DA INVENÇÃO

No. Ref. Ab - Tipo de Cadeia	SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA
04536 VL	1	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTA ATAAGTATGTTTCATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGCTGAT TCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGGCTTATGATTCTTCTATGCTTC GTGTGTTTGGCGGC GGCACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
05087 VL	2	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTA ATAAGTATGTTTCATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGCTGAT TCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGTCTTATGCTAATTATCATGATT CTTGGGTGTTTGGC GGCGGCACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
05088 VL	3	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC

		CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTA ATAAGTATGTTTCATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGCTGAT TCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGTCTTATGCTTCTGATTATACTT CTTGGGTGTTTGGC GGCGGCACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
05091 VL	4	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTA ATAAGTATGTTTCATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGCTGAT TCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGTCTTATGCTCATTATCATGATA TTTGGGTGTTTGGC GGCGGCACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
05092 VL	5	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTA ATAAGTATGTTTCATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGCTGAT TCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG

		CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGGCTCATGATTCTCTTTATTCTC GTGTGTTTGGCGGC GGCACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
04687 VL	6	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGG CGGTGAGCCTGGGCGA ACGTGCGACCATTAACTGCAGAAGCAGCCAGTCTA TTCTTTATGGTATTA ACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCA GGTCAGCCGCCGAAA CTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGG GGTCCCGGATCGTTT TAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTTTCGTCCCTGC AAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCA GTATTATAATCATCCT CATACCTTTGGCCAGGG- TACGAAAGTTGAAATTAACGTACG
05097 VL	7	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGG CGGTGAGCCTGGGCGA ACGTGCGACCATTAACTGCAGAAGCAGCCAGTCTA TTCTTTATGGTATTA ACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCA GGTCAGCCGCCGAAA CTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGG GGTCCCGGATCGTTT TAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTTTCGTCCCTGC AAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCA GTATGCTTTTGGTTGG ACCTTTGGCCAGGGTAC- GAAAGTTGAAATTAACGTACG
05098 VL	8	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGG

		CGGTGAGCCTGGGCGA ACGTGCGACCATTA ACTGCAGAAGCAGCCAGTCTA TTCTTTATGGTATTA ACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCA GGTCAGCCGCCGAAA CTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGG GGTCCCGGATCGTTT TAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTTTCGTCCCTGC AAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCTTCAG TATTCTGATGAGCCT TGGACCTTTGGCCAGGG- TACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG
05100 VL	9	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGG CGGTGAGCCTGGGCGA ACGTGCGACCATTA ACTGCAGAAGCAGCCAGTCTA TTCTTTATGGTATTA ACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCA GGTCAGCCGCCGAAA CTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGG GGTCCCGGATCGTTT TAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTTTCGTCCCTGC AAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCA GTATGCTTATGAGCCT AATACCTTTGGCCAGGG- TACGAAAGTTGAAATTAAACGTACG
05101 VL	10	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGG CGGTGAGCCTGGGCGA ACGTGCGACCATTA ACTGCAGAAGCAGCCAGTCTA TTCTTTATGGTATTA ACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCA GGTCAGCCGCCGAAA CTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGG

		GGTCCCGGATCGTTT TAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTTTCGTCCCTGC AAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCTTCAG TATGCTTTTTTCTCCT TGGACCTTTGGCCAGGG- TACGAAAGTTGAAATTAACGTACG
04541 VL	11	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATATTGGTT CTTATTATGTTTATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGATGAT AATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGTCTTATGATTTTCCTTCTATTGT GTTTGGCGGCGGC ACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
05093 VL	12	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATATTGGTT CTTATTATGTTTATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGATGAT AATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGTCTTATGATTCTTATATTTTGT GTTTGGCGGCGGC ACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG

05094 VL	13	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATATTGGTT CTTATTATGTTTATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGATGAT AATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCTCTACTTATGATGCTTTTACTTTTGT GTTTGGCGGCGGC ACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
05095 VL	14	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATATTGGTT CTTATTATGTTTATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGATGAT AATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGTCTTATGATAAGTATGTTTTTGT GTTTGGCGGCGGC ACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
04537 VL	15	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTCTTCGTT CTTATTTTGTTTCTT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGATGAT

		GATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTA GCGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCGCTTCTTGGGATACTCTTTCTGATG TTGAGGTGTTTGGC GGCGGCACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
05102 VL	16	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTCTTCGTT CTTATTTTGTTTCTT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGATGAT GATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTA GCGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCGCTTCTTGGGATCCTCCTTCTGCTT TTGAGGTGTTTGGC GGCGGCACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
05105 VL	17	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTCTTCGTT CTTATTTTGTTTCTT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGATGAT GATGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTA GCGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCGCTTCTTGGGATAATGATCATTTTG AGGTGTTTGGCGGC GGCACGAAGTTA-

		ACCGTTCTTGGCCAG
04690 VL	18	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAAGCTTGGT TCTTATTTTGTTTATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGATGAT GATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGTCTTTTGGTATTTCTAATTTTA TGTGTTTGGCGGC GGCACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
05106 VL	19	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAAGCTTGGT TCTTATTTTGTTTATT GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGATGAT GATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCGGTTCTTGGGCTTATCTTGGTGATG TGTTTGGCGGCGGC ACGAAGTTA- ACCGTTCTTGGCCAG
04682 VL	20	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCGAAAG CCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGATATTCCT TACTAATTATGGTA TTGCTTGGGTGCGCCAGATGCCTGGGAAGGGTCT

		CGAGTGGATGGGCATT ATCTATCCGTCTGATAGCTATACCAATTATTCTCCG AGCTTTCAGGGCCA GGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGCATTAGCACC GCGTATCTTCAATGGA GCAGCCTGAAAGCGAGCGATACGGCCATGTATTA TTGCGCGCGTATGTCT TATGATTATCAGCATCAGGCTCCTTCTATGGATTCT TGGGGCCAAGGCAC CCTGGTGACGGTTAGCTCA
04536 VH	21	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCGCGAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCT TACTGGTTATTATA TGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCATT ATCAATCCGTGGACTGGCAATACGAATTACGCGCA GAAGTTTCAGGGCCG GGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACC GCGTATATGGAAGTGA GCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTA TTGCGCGCGTGATCCT GGTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGC CAAGGCACCCTGGT GACGGTTAGCTCA
05078 VH	22	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCGCGAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCT TACTGGTTATTATA TGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCATT ATTGATCCTTGGAATGGTCAGACTAATTATGCTCA GAAGTTTCAGGGTCG GGTCACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACC

		GCGTATATGGA ACTGA GCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTA TTGCGCGCGTGATCCT GGTTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGC CAAGGCACCCTGGT GACGGTTAGCTCA
05079 VH	23	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGA AAAAACC GGGCGCGAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCT TTA CTGGTTATTATA TGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCGTT TTGATCCTTGGAATGGTATTACTAATTATGCTCAG GTTTCAGGGTCG CTCACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACC GGTATATGGA ACTGA GCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTA TTGCGCGCGTGATCCT GGTTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGC CAAGGCACCCTGGT GACGGTTAGCTCA
04687 VH	24	CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGA AAAAACC GGGCAGCAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACT TTTTCTTCTTATGCTA TTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCGGT ATCGATCCGTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAA GTTTCAGGGCCGGGT GACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCG TATATGGA ACTGAGCA GCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGTTTATCAG GATGTTTGGGGCCAAGG- CACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

05081 VH	25	CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCAGCAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACT TTTTCTTCTTATGCTA TTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCGGT ATTGATCCTATTATGGGTACTGAGTATGCTCAGAA GTTTCAGGGTTCGGGT GACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCG TATATGGAAGTGA GCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGTTTATCAG GATGTTTGGGGCCAAGG- CACCTGGTGACGGTTAGCTCA
05082 VH	26	CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCAGCAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACT TTTTCTTCTTATGCTA TTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCGAG ATTGATCCTGTTATTGGTGAGACTGATTATGCTCA GAAGTTTCAGGGTCG GGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCC GCGTATATGGAAGTGA GCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTA TTGCGCGCGTGTTTAT CAGGATGTTTGGGGCCA- AGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
04541 VH	27	CAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGG TGAAACCGGGCGAAAC CCTGAGCCTGACCTGCACCGTTTCCGGAGGTAGC ATTTCTTCTTCTTCTT ATTATTGGAATTGGATTCGCCAGGCCCTGGGAAG GGTCTCGAGTGGATT

		GGCGAGATCTATTTTGGCTGGACCTATTATAATCC GAGCCTGAAAGGCCG GGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCACT TTAGCCTGAAACTGA GCAGCGTGACGGCGGAAGATACGGCCGTGTATTA TTGCGCGCGTGGTTAT GAGTTTCATGGTTATACTACTTTTGATTATTGGGGC CAAGGCACCCTGGT GACGGTTAGCTCA
04537 VH	28	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCGAAAG CCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGATATTCCT TTTCTAATTATTGGA TTGGTTGGGTGCGCCAGATGCCTGGGAAGGGTCT CGAGTGGATGGGCTTT ATCTTTCCGGATACTAGCTATACCCGTTATTCTCCG AGCTTTCAGGGCCA GGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGCATTAGCACC GCGTATCTTCAATGGA GCAGCCTGAAAGCGAGCGATACGGCCATGTATTA TTGCGCGCGTGTAAAG CTTATTACTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACGGTTAGCTCA
04690 VH	29	CAGGTGCAATTGCAACAGTCTGGTCCGGGCCTGG TGAAACCGAGCCAAAC CCTGAGCCTGACCTGTGCGATTTCCGGAGATAGC GTGAGCTCTAATTCTG CTGCTTGGGGTTGGATTGCGCAGTCTCCTGGGCG TGGCCTCGAGTGGCTG GGCCGTATCTATTATCGTAGCAAGTGGGTAAACGA TTATGCGGTGAGCGT GAAAAGCCGGATTACCATCAACCCGGATACTTCGA AAAACCAAGTTTAGCC

		TGCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCG CGTCAGGGTGCTGTTTATCCTGGTCCTTATGGTTT TGATGTTTGGGGCCA AGGCACCCTGGTGACGGT- TAGCTCA
04682 VH	30	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTG GCGCACCAGGTCAGCG TGTGACCATCTCGTGTAGCGGCAGCAGCAGCAAC ATTGGTTCTAATTATG TGATTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCC GAACTTCTGATTTAT GATGATACTAATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATC GTTTTAGCGGATCCAA AAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGC CTGCAAAGCGAAGACG AAGCGGATTATTATTGCTCTACTTATGATAATTATC AGGCTGGTTGGGTG TTTGGCGGCGGCACGA- AGTTAACCGTTCTTGCCAG
04536 VL	31	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQAYDSSMLRVFGG GTKLTVLGQ
05087 VL	32	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYANYHDSWVFG GGTKLTVLGQ
05088 VL	33	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYASDYTSWVFG GGTKLTVLGQ
05091 VL	34	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD

		SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYAHYHDIWVFG GGTKLTVLGQ
05092 VL	35	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQAHDSLVSFVFGG GGTKLTVLGQ
04687 VL	36	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCQQYYNHP HTFGQGTKVEIKRT
05097 VL	37	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCQQYAFGW TFGQGTKVEIKRT
05098 VL	38	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCLQYSDEP WTFQGGTKVEIKRT
05100 VL	39	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCQQYAYEP NTFQGGTKVEIKRT
05101 VL	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCLQYAFSP WTFQGGTKVEIKRT
04541 VL	41	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSYVYVYQ QKPGQAPVLVIY DDNDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEAD YYCQSYDFPSIVFG GGTKLTVLGQ
05093 VL	42	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSYVYVYQ QKPGQAPVLVIYDD

		NDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYDSYIFVFGGG TKLTVLGQ
05094 VL	43	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSYVYVYQ QKPGQAPVLVIYDD NDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CSTYDAFTFVFGGG TKLTVLGQ
05095 VL	44	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSYVYVYQ QKPGQAPVLVIYDD NDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYDKYVVFVFGGG TKLTVLGQ
04537 VL	45	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRSYFVSWYQ QKPGQAPVLVIYDD DDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CASWDTLSDVEVFG GGTKLTVLGQ
05102 VL	46	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRSYFVSWYQ QKPGQAPVLVIYDD DDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CASWDPPSAFEVFG GGTKLTVLGQ
05105 VL	47	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSLRSYFVSWYQ QKPGQAPVLVIYDD DDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CASWDNDHFEVFGG GTKLTVLGQ
04690 VL	48	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDKLGSYFVYVYQ QKPGQAPVLVIYDD DNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSFGISNFYVFGG GTKLTVLGQ
05106 VL	49	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDKLGSYFVYVYQ QKPGQAPVLVIYDD DNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CGSWAYLGDVFGGG TKLTVLGQ
04682 VL	50	DIVLTQPPSVSGAPGQRTISCSGSSSNIGSNYVIWY QQLPGTAPKLLIY

		DDTNRPSGVPDRFSGSGSKSGTSASLAITGLQSEDEAD YYCSTYDNYQAGWV FGGGTKLTVLGQ
05174 VL	51	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYANYHDSWVFG GGTKLTVLGQ
05184 VL	52	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYAHYHDIWVFG GGTKLTVLGQ
05185 VL	53	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCQQYAYEP NTFGQGGTKVEIKRT
05186 VL	54	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCLQYAFSP WTFGQGGTKVEIKRT
04536 VH	55	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGI INPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL RSED TAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS
05078 VH	56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGI IDPWNGQTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL RSED TAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS
05079 VH	57	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGV IDPWNGITNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLR SED TAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS
04687 VH	58	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG

		IDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DWWGQGTLVTVSS
05081 VH	59	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG IDPIMGTEYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DWWGQGTLVTVSS
05082 VH	60	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGE IDPVIGETDYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARVY QDVWGQGTLVTVSS
04541 VH	61	QVQLQESGPGGLVKPGETLSLTCTVSGGSISSSSYYW NWIRQAPGKGLEWI GEIYFGWTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AEDTAVYYCARGY EFHGYTTFDYWGGQTLVTVSS
04537 VH	62	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIG WVRQMPGKGLEWMGF IFPDTSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCARVK LITDYWGQGTLVTVSS
04690 VH	63	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAW GWIRQSPGRGLEWL GRIYYRSKWVNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLN SVTPEDTAVYYCA RQGAVYPGPYGFVDWGQG- TLVTVSS
04682 VH	64	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYGIAW VRQMPGKGLEWMGI IYPSDSYTNYSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCARMS YDYQHQAPSMDSWGQG- TLVTVSS
05087 VH	65	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMN WVRQAPGQGLEWMGI INPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL RSEDTAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS

05091 VH	66	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGI INPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL RSEDVAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS
05097 VH	67	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG IDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DWWGQGTLVTVSS
05098 VH	68	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG IDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DWWGQGTLVTVSS
05174 VH	69	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGI IDPWNGQTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL RSEDVAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS
05184 VH	70	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGI IDPWNGQTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL RSEDVAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGTLVTVSS
05185 VH	71	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG IDPIMGTEYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DWWGQGTLVTVSS
05186 VH	72	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG IDPIMGTEYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DWWGQGTLVTVSS
05091_Ig lambda	73	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCG TTGCACCAGGTCAGAC CGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATTCTATTGGTA ATAAGTATGTTTCATT

		GGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCT TGTGATTTATGCTGAT TCTGATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAG CGGATCCAACAGCGG CAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAG GCGGAAGACGAAGCGG ATTATTATTGCCAGTCTTATGCTCATTATCATGATA TTTGGGTGTTTGGC GGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCA AGGCTGCCCCCTCGGT CACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAG CCAACAAGGCCACAC TGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCC GTGACAGTGGCCTGG AAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTG GAGACCACCACACCCTC CAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGC TATCTGAGCCTGACGC CTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTG CCAGGTCACGCATGAA GGGAGCACCGTGGAGA- AGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
05185_Ig capa	74	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGG CGGTGAGCCTGGGCGA ACGTGCGACCATTA ACTGCAGAAGCAGCCAGTCTA TTCTTTATGGTATTA ACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCA GGTCAGCCGCCGAAA CTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGG GGTCCCGGATCGTTT TAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTTTCGTCCCTGC AAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCA

		GTATGCTTATGAGCCT AATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAA ACGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAA GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACCTCCAGGAGAG TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGTTAG
05098_lg capa	75	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGG CGGTGAGCCTGGGCGA ACGTGCGACCATTAATACTGCAGAAGCAGCCAGTCTA TTCTTTATGGTATTA ACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCA GGTCAGCCGCCGAAA CTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGG GGTCCCGGATCGTTT TAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTTTCGTCCCTGC AAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCTTCAG TATTCTGATGAGCCT TGGACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAA ACGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT

		CCCAGAGAGGCCAAA GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACCTCCAGGAGAG TGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGTTAG
05097_Ig capa	76	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCGGATAGCCTGG CGGTGAGCCTGGGCGA ACGTGCGACCATTAAGTGCAGAAGCAGCCAGTCTA TTCTTTATGGTATTA ACAATAATTTTCTGGGTTGGTACCAGCAGAAACCA GGTCAGCCGCCGAAA CTATTAATTTATTGGGCTTCTACTCGTGAAAGCGG GGTCCCGGATCGTTT TAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTTCTGTCCTGC AAGCTGAAGACGTGGCGGTGTATTATTGCCAGCA GTATGCTTTTGGTTGG ACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACG TACGGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAACTG CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC CTCAGCAGCACCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT

		CTACGCCTGCGAAGTC ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGA GTGTTAG
05091_lg lambda	77	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYAHYHDIWVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
05087_lg lambda	78	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYANYHDSWVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
05174_lg lambda	79	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYANYHDSWVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
05184_lg lambda	80	DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGNKYVHWYQ QKPGQAPVLVIYAD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYAHYHDIWVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL

		ISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVPTECS
05185_Ig capa	81	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQYAYEP NTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT SKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
05098_Ig capa	82	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCLQYSDEP WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT SKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
05097_Ig capa	83	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQYAFGW TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAK QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT KADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
05186_Ig capa	84	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYGINNNFL GWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCLQYAFSP WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

		VCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
05091_lg G4	85	CAGGTGCAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCGCGAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGATATACCT TACTGGTTATTATA TGAATTGGGTCCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCATT ATCAATCCGTGGACTGGCAATACGAATTACGCGCA GAAGTTTCAGGGCCG GGTGACCATGACCCGTGATACCAGCATTAGCACC GCGTATATGGAAGTGA GCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTA TTGCGCGCGTGATCCT GGTTTTTTTTATTATACTCCTTCTGATCTTTGGGGC CAAGGCACCCTGGT GACGGTTAGCTCAGCTTCCACCAAGGGACCATCC GTCTTCCCCCTGGCGC CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGC CCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAAGTACAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTA CAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACGAAG ACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAA GAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCAT CATGCCCAGCACCTG AGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCC

		CCAAAACCCAAGGAC ACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGT GCGTGGTGGTGGACGT GAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG TACGTGGATGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAACGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC CTCCCGTCCTCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAGCCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAAC CGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CTGGGTAAATGA
05185_Ig G4	86	CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCAGCAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACT TTTTCTTCTTATGCTA TTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCGGT ATTGATCCTATTATGGGTACTGAGTATGCTCAGAA

		GTTTCAGGGTCGGGT GACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCG TATATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGTTTATCAG GATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTA GCTCAGCTTCCACCAA GGGACCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCC AGGAGCACCTCCGAGA GCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCACCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC CTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGTCCAAATATGGTCC CCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTG GGGGGACCATCAGTCT TCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATG ATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAG GAAGACCCCGAGGTCCA GTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCGTCCCTCCATCGAGAAAACCA

		TCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCAGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACCT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTAC AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGG AGGGGAATGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACACAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCTGGGTA- AATGA
05098_Ig G4	87	CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCAGCAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACT TTTTCTTCTTATGCTA TTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCGGT ATCGATCCGTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAA GTTTCAGGGCCGGGT GACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCG TATATGGAACCTGAGCA GCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGTTTATCAG GATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTA GCTCAGCTTCCACCAA GGGACCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCC AGGAGCACCTCCGAGA GCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTG

	ACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC CTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGTCCAAATATGGTCC CCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTG GGGGGACCATCAGTCT TCCTGTTCCCCC AAAACCCAAGGACACTCTCATG ATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAG GAAGACCCCGAGGTCCA GTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCAGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAAC ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTAC AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGG AGGGGAATGTCTTCTC

		ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACACAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCTGGGTA- AATGA
05097_Ig G4	88	CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCAGCAG CGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGAGGCACT TTTTCTTCTTATGCTA TTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCT CGAGTGGATGGGCGGT ATCGATCCGTTTGGCACTGCGAATTACGCGCAGAA GTTTCAGGGCCGGGT GACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCG TATATGGAAGTGA GCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGTTTATCAG GATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTA GCTCAGCTTCCACCAA GGGACCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCC AGGAGCACCTCCGAGA GCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC CTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGTCCAAATATGGTCC CCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTG GGGGGACCATCAGTCT TCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATG

		ATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAG GAAGACCCCGAGGTCCA GTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCAGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACCT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTAC AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGG AGGGGAATGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACACAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCTGGGTA- AATGA
05091_Ig G4	89	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGI INPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL RSEDVAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTK

		TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHN HYTQKSLSLSLGK
05185_Ig G4	90	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG IDPIMGTEYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDS DGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV- MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
05098_Ig G4	91	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG IDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA

		ALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTKTYTCNV KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQQE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV- MHEALHNHYTQKSLSLGLK
05097_Ig G4	92	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG IDPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DWWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTKTYTCNV KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQQE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV- MHEALHNHYTQKSLSLGLK
05087_Ig G4	93	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGI INPWTGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL

		RSED TAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTK TYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPSCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
05174_Ig G4	94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGI IDPWNGQTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL RSED TAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTK TYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPSCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN

		HYTQKSLSLSLGK
05184_Ig G4	95	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMGI IDPWNGQTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSL RSEDVAVYYCARDP GFFYYTPSDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
05186_Ig G4	96	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGG IDPIMGTEYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVYQ DWWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP

		REPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV- MHEALHNHYTQKSLSLGLGK

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Novartis AG

<120> COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO PARA ANTICORPOS DE c-Met

5 <130> ON/4-34782A

<150> US 60/787556

<151> 2006-03-30

<160> 96

<170> PatentIn version 3.3

10 <210> 1

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

15 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcggtgcac caggtcagac cgcgcg-
tata 60

tcgtgtagcg gcgattctat tggtaataag tatgttcatt ggtaccagca gaa-
accggg 120

caggcgccag ttcttgatgat ttatgctgat tctgacgtc cctcaggcat cccgga-
acgc 180

20 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg ccaggcttat gattcttcta tgcttcgtgt
gtttggcggc 300

25 ggcacgaagt taaccgttct tggccag 327

<210> 2

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30 <400> 2

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcggtgcac caggtcagac cgcgcg-
tata 60

tctgttagcg gcgattctat tggtaataag tatgttcatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgctgat tctgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

5 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg ccagtcttat gctaattatc atgattcttg
 ggtgtttggc 300

ggcggcacga agttaaccgt tcttggccag 330

10 <210> 3

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

15 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagt agcgttgac caggtcagac cgcgcg-
 tatc 60

tctgttagcg gcgattctat tggtaataag tatgttcatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgctgat tctgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

20 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg ccagtcttat gcttctgatt atacttcttg
 ggtgtttggc 300

25 ggcggcacga agttaaccgt tcttggccag 330

<210> 4

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30 <400> 4

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagt agcgttgac caggtcagac cgcgcg-
 tatc 60

tcgtgtagcg gcgattctat tggtaataag tatgttcatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgctgat tctgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

5 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg ccagtcttat gctcattatc atgatatttg
 ggtgtttggc 300

ggcggcacga agttaaccgt tcttggccag 330

10 <210> 5

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

15 gatatcgaac tgacccagcc gccttcagtg agcggtgcac caggtcagac cgcgcg-
 tatc 60

tcgtgtagcg gcgattctat tggtaataag tatgttcatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgctgat tctgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

20 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg ccaggctcat gattctcttt attctcgtgt
 gtttggcggc 300

25 ggcacgaagt taaccgttct tggccag 327

<210> 6

<211> 342

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30 <400> 6

gatatcgtga tgacccagag cccggatagc ctggcggtga gcctgggcca acgtgc-
 gacc 60

attaactgca gaagcagcca gtctattctt tatggtatta acaataattt
 tctgggttgg 120
 taccagcaga aaccaggtca gccgccgaaa ctattaattt attgggcttc
 tactcgtgaa 180
 5 agcgggggtcc cggatcgttt tagcggctct ggatccggca ctgattttac cctgac-
 catt 240
 tcgtccctgc aagctgaaga cgtggcggtg tattattgcc agcagtatta taat-
 catcct 300
 catacctttg gccagggtac gaaagttgaa attaaacgta cg 342
 10 <210> 7
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 15 gatatcgtga tgaccagag cccggatagc ctggcggtga gcctgggcga acgtgc-
 gacc 60
 attaactgca gaagcagcca gtctattctt tatggtatta acaataattt
 tctgggttgg 120
 taccagcaga aaccaggtca gccgccgaaa ctattaattt attgggcttc
 20 tactcgtgaa 180
 agcgggggtcc cggatcgttt tagcggctct ggatccggca ctgattttac cctgac-
 catt 240
 tcgtccctgc aagctgaaga cgtggcggtg tattattgcc agcagtatgc
 ttttggttgg 300
 25 acctttggcc agggtagcaa agttgaaatt aaacgtacg 339
 <210> 8
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 8
 gatatcgtga tgaccagag cccggatagc ctggcggtga gcctgggcga acgtgc-
 gacc 60

4 attaactgca gaagcagcca gtctattctt tatggtatta acaataattt
 tctggggttg 120
 taccagcaga aaccaggtca gccgccgaaa ctattaattt attgggcttc
 tactcgtgaa 180
 5 agcgggggtcc cggatcgttt tagcggctct ggatccggca ctgattttac cctgac-
 catt 240
 tcgtccctgc aagctgaaga cgtggcggtg tattattgcc ttcagtattc tgat-
 gagcct 300
 tggacctttg gccagggtac gaaagttgaa attaaacgta cg 342
 10 <210> 9
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 15 gatatcgtga tgacccagag cccggatagc ctggcggtga gcctgggcga acgtgc-
 gacc 60
 attaactgca gaagcagcca gtctattctt tatggtatta acaataattt
 tctggggttg 120
 taccagcaga aaccaggtca gccgccgaaa ctattaattt attgggcttc
 20 tactcgtgaa 180
 agcgggggtcc cggatcgttt tagcggctct ggatccggca ctgattttac cctgac-
 catt 240
 tcgtccctgc aagctgaaga cgtggcggtg tattattgcc agcagtatgc ttat-
 gagcct 300
 25 aatacctttg gccagggtac gaaagttgaa attaaacgta cg 342
 <210> 10
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 10
 gatatcgtga tgacccagag cccggatagc ctggcggtga gcctgggcga acgtgc-
 gacc 60

attaactgca gaagcagcca gtctattctt tatggtatta acaataattt
 tctgggttgg 120
 taccagcaga aaccaggtca gccgccgaaa ctattaattt attgggcttc
 tactcgtgaa 180
 5 agcgggggtcc cggatcgttt tagcggctct ggatccggca ctgattttac cctgac-
 catt 240
 tcgtccctgc aagctgaaga cgtggcggtg tattattgcc ttcagtatgc
 tttttctcct 300
 tggacctttg gccagggtac gaaagttgaa attaaacgta cg 342
 10 <210> 11
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 15 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgcac caggtcagac cgcgcg-
 tate 60
 tcgtgtagcg gcgataatat tggttcttat tatgtttatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120
 caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aatgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 20 acgc 180
 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg ccagtcttat gattttcctt ctattgtgtt
 tggcggcggc 300
 25 acgaagttaa ccgttcttgg ccag 324
 <210> 12
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 12
 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgcac caggtcagac cgcgcg-
 tate 60

tcgtgtagcg gcgataatat tggttcttat tatgtttatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aatgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

5 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg ccagtcttat gattcttata tttttgtgtt
 tggcggcggc 300

acgaagttaa ccgttcttgg ccag 324

10 <210> 13

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

15 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcg-
 tatc 60

tcgtgtagcg gcgataatat tggttcttat tatgtttatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aatgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

20 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg ctctacttat gatgctttta cttttgtgtt
 tggcggcggc 300

25 acgaagttaa ccgttcttgg ccag 324

<210> 14

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30 <400> 14

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcg-
 tatc 60

tcgtgtagcg gcgataatat tggttcttat tatgtttatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aatgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

5 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcgga 240

gacgaagcgg attattattg ccagtcttat gataagtatg tttttgtgtt
 tggcggcggc 300

acgaagttaa ccgttcttgg ccag 324

10 <210> 15
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

15 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcg-
 tatc 60

tcgtgtagcg gcgattctct tcgttcttat tttgtttctt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat gatgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

20 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcgga 240

gacgaagcgg attattattg cgcttcttgg gatactcttt ctgatgttga
 ggtgtttggc 300

25 ggcggcacga agttaaccgt tcttgccag 330

<210> 16
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30 <400> 16

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcg-
 tatc 60

tcggtgtagcg gcgattctct tcgttcttat tttgtttctt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat gatgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

5 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg cgcttcttgg gatcctcctt ctgcttttga
 ggtgtttggc 300

ggcggcacga agttaaccgt tcttggccag 330

10 <210> 17

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

15 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcggtgcac caggtcagac cgcgcg-
 tate 60

tcggtgtagcg gcgattctct tcgttcttat tttgtttctt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat gatgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

20 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg cgcttcttgg gataatgac attttgaggt
 gtttggcggc 300

25 ggcacgaagt taaccgttct tggccag 327

<210> 18

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30 <400> 18

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcggtgcac caggtcagac cgcgcg-
 tate 60

tcgtgtagcg gcgataagct tggttcttat tttgtttatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120
 caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat gataatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

5 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg ccagtctttt ggtatttcta atttttatgt
 gtttggcggc 300
 ggcacgaagt taaccgttct tggccag 327

10 <210> 19
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

15 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcg-
 tatc 60
 tcgtgtagcg gcgataagct tggttcttat tttgtttatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120
 caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat gataatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180

20 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg cggttcttgg gcttatcttg gtgatgtggt
 tggcggcggc 300

25 acgaagttaa ccgttcttgg ccag 324
 <210> 20
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30 <400> 20
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgaaag cctgaa-
 aatt 60

agctgcaaag gttccggata ttcctttact aattatggta ttgcttgggt gcgcca-
 gatg 120
 cctgggaagg gtctcgagtg gatgggcatt atctatccgt ctgatagcta tacca-
 attat 180
 5 tctccgagct ttcagggcca ggtgaccatt agcgcgata aaagcattag
 caccgcgtat 240
 cttcaatgga gcagcctgaa agcgagcgat acggccatgt attattgcgc gcg-
 tatgtct 300
 tatgattatc agcatcaggc tccttctatg gattcttggg gccaaaggcac cctggg-
 10 gacg 360
 gttagctca 369
 <210> 21
 <211> 363
 <212> DNA
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaa-
 agtg 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact gggtattata tgaattgggt ccgcca-
 20 agcc 120
 cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcatt atcaatccgt ggactggcaa tacga-
 attac 180
 gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag
 caccgcgtat 240
 25 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgt-
 gaccc 300
 ggtttttttt attatactcc ttctgatctt tggggccaag gcaccctggg gacgg-
 tagc 360
 tca 363
 30 <210> 22
 <211> 363
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtagaaaaac cgggcgag cgtgaa-
agtg 60

5 agctgcaaag cctccgata tacctttact ggttattata tgaattgggt ccgcca-
agcc 120

cctgggcagg gtctcgagt gatgggcatt attgatacctt ggaatgggtca gacta-
attat 180

10 gtcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag
caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgt-
gatacct 300

ggtttttttt attataactcc ttctgatacct tggggccaag gcaccctgggt gacgggt-
tagc 360

15 tca 363

<210> 23

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <400> 23

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtagaaaaac cgggcgag cgtgaa-
agtg 60

agctgcaaag cctccgata tacctttact ggttattata tgaattgggt ccgcca-
agcc 120

25 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcgtt attgatacctt ggaatgggtat tacta-
attat 180

gtcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag
caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgt-
gatacct 300

30 ggtttttttt attataactcc ttctgatacct tggggccaag gcaccctgggt gacgggt-
tagc 360

tca 363

<210> 24

<211> 339

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 24

caggtgcaat tggttcagtc tggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaa-
agtg 60

10 agctgcaaag cctccggagg cactttttct tcttatgcta tttcttgggt gcgcca-
agcc 120

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggt atcgatccgt ttggcactgc gaat-
tacg 180

cagaagtttc agggccgggt gaccattacc gcggatgaaa gcaccagcac cgcgta-
tatg 240

15 gaactgagca gcctgcgtag cgaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tggt-
tatcag 300

gatgtttggg gccaaaggcac cctggtgacg gtttagctca 339

<210> 25

<211> 339

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

caggtgcaat tggttcagtc tggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaa-
agtg 60

25 agctgcaaag cctccggagg cactttttct tcttatgcta tttcttgggt gcgcca-
agcc 120

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggt attgataccta ttatgggtac tgag-
tatgct 180

cagaagtttc agggtcgggt gaccattacc gcggatgaaa gcaccagcac cgcgta-
tatg 240

30 gaactgagca gcctgcgtag cgaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tggt-
tatcag 300

gatgtttggg gccaaaggcac cctgggtgacg gtttagctca 339

<210> 26

<211> 342

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 26

caggtgcaat tgggttcagtc tggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaa-
agtg 60

agctgcaaag cctccggagg cactttttct tcttatgcta tttcttgggt gcgcca-
10 agcc 120

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcgag attgatcctg ttattgggtga gact-
gattat 180

gctcagaagt ttcaggggtcg ggtgaccatt accgcggatg aaagcaccag
caccgcgtat 240

15 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc
gcgtgtttat 300

caggatgttt ggggccaagg caccctgggtg acggtttagct ca 342

<210> 27

<211> 363

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

caggtgcaat tgcaagaaag tgggtccgggc ctggtgaaac cgggcgaaac cct-
gagcctg 60

25 acctgcaccg tttccggagg tagcatttct tcttcttctt attattggaa ttg-
gattcgc 120

caggccccctg ggaaggggtct cgagtggatt ggcgagatct attttggctg gacc-
tattat 180

aatccgagcc tgaaaggccg ggtgaccatt agcgttgata cttcgaaaaa ccagtt-
30 tagc 240

ctgaaactga gcagcgtgac ggcggaagat acggccgtgt attattgcgc
gcgtggttat 300

gagtttcatg gttatactac ttttgattat tggggccaag gcaccctggt gacggt-
 tagc 360
 tca 363
 <210> 28
 5 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgaaag cctgaa-
 10 aatt 60
 agctgcaaag gttccggata ttcttttct aattattgga ttggttgggt gcgcca-
 gatg 120
 cctgggaagg gtctcgagt gatgggcttt atctttccgg atactagcta
 taccggttat 180
 15 tctccgagct ttcagggcca ggtgaccatt agcgcgata aaagcattag
 caccgcgtat 240
 cttcaatgga gcagcctgaa agcgagcgat acggccatgt attattgcgc gcgtgt-
 taag 300
 cttattactg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca
 20 348
 <210> 29
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 29
 caggtgcaat tgcaacagtc tgggtccgggc ctggtgaaac cgagccaaac cct-
 gagcctg 60
 acctgtgcga tttccggaga tagcgtgagc tctaattctg ctgcttgggg ttg-
 gattcgc 120
 30 cagtctcctg ggcgtggcct cgagtggctg ggccgtatct attatcgtag ca-
 agtggggtt 180
 aacgattatg cggtgagcgt gaaaagccgg attaccatca acccgatac ttcgaa-

aaac 240
 cagtttagcc tgcaactgaa cagcgtgacc ccggaagata cggccgtgta
 ttattgcgcg 300
 cgtcagggtg ctgtttatcc tggtccttat ggttttgatg tttggggcca agg-
 5 caccctg 360
 gtgacgggta gctca 375
 <210> 30
 <211> 336
 <212> DNA
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 gatatcgtgc tgaccagcc gccttcagtg agtggcgcac caggtcagcg tgtgac-
 catc 60
 tcgtgtagcg gcagcagcag caacattggc tctaattatg tgatttggtta ccag-
 15 cagttg 120
 cccgggacgg cgccgaaact tctgatttat gatgatacta atcgtccctc
 aggcgtgccg 180
 gatcgtttta gcggatccaa aagcggcacc agcgcgagcc ttgcgattac
 gggcctgcaa 240
 20 agcgaagacg aagcggatta ttattgctct acttatgata attatcaggc
 tggttgggtg 300
 tttggcggcg gcacgaagtt aaccgttctt ggccag 336
 <210> 31
 <211> 109
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 Gln
 30 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
 Val

20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
 Tyr
 35 40 45
 5 Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 Glu
 10 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Tyr Asp Ser Ser Met Leu
 Arg
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 15 100 105
 <210> 32
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(110)
 <223> Idêntica à SEQ ID NO:51
 <400> 32
 25 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
 Val
 30 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
 Tyr

35 40 45
 Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 50 55 60
 5 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Asn Tyr His Asp
 Ser
 10 85 90 95
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 <210> 33
 <211> 110
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 Gln
 20 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
 Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
 25 Tyr
 35 40 45
 Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 50 55 60
 30 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Asp Tyr Thr
Ser

85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

5 100 105 110

<210> 34

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1)..(110)

<223> Idêntica à SEQ ID NO:52

<400> 34

15 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
Val

20 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

35 40 45

Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
25 Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
Glu

65 70 75 80

30 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala His Tyr His Asp
Ile

85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

<210> 35

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

10 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
15 Tyr

35 40 45

Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser

50 55 60

20 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala His Asp Ser Leu Tyr Ser
Arg

25 85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105

<210> 36

<211> 114

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
 5 Gly
 20 25 30
 Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 Pro
 35 40 45
 10 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 Ile
 15 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 Tyr
 85 90 95
 Tyr Asn His Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 20 Lys
 100 105 110
 Arg Thr

 <210> 37
 25 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 30 Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr

Gly

20 25 30

Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
Pro

5 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
Pro

50 55 60

10 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
Ile

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
Tyr

85 90 95

15 Ala Phe Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
Arg

100 105 110

Thr

20 <210> 38

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
Gly

30 20 25 30

Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
Pro

35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 Pro
 50 55 60
 5 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln
 Tyr
 10 85 90 95
 Ser Asp Glu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 Lys
 100 105 110
 Arg Thr
 15
 <210> 39
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(114)
 <223> Idêntica à SEQ ID NO:53
 <400> 39
 25 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
 Gly
 30 20 25 30
 Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 Pro

35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 Pro
 50 55 60
 5 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 Tyr
 10 85 90 95
 Ala Tyr Glu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 Lys
 100 105 110
 Arg Thr
 15
 <210> 40
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(114)
 <223> Idêntica à SEQ ID NO:54
 <400> 40
 25 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
 Gly
 30 20 25 30
 Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 Pro

35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 Pro
 50 55 60
 5 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln
 Tyr
 10 85 90 95
 Ala Phe Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 Lys
 100 105 110
 Arg Thr
 15
 <210> 41
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 41
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr
 25 Val
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
 Tyr
 35 40 45
 30 Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Phe Pro Ser Ile
 5 Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105
 <210> 42
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 15 Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr
 Val
 20 25 30
 20 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
 Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 25 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Tyr Ile Phe
 30 Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105
 <210> 43
 <211> 108
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 Gln
 1 5 10 15
 10 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr
 Val
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
 Tyr
 15 35 40 45
 Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 20 Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Tyr Asp Ala Phe Thr Phe
 Val
 85 90 95
 25 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105
 <210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly

Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr
Val

5 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

 35 40 45

Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
10 Ser

 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
Glu

65 70 75 80

15 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Lys Tyr Val Phe
Val

 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

 100 105

20 <210> 45
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 45

25 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Phe
Val

30 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

35 40 45
 Asp Asp Asp Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 50 55 60
 5 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Thr Leu Ser Asp
 Val
 10 85 90 95
 Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 <210> 46
 <211> 110
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 Gln
 20 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Phe
 Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
 25 Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Asp Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 50 55 60
 30 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Pro Pro Ser Ala
Phe

85 90 95

Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

5 100 105 110

<210> 47

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 47

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Phe

15 Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

35 40 45

20 Asp Asp Asp Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
Glu

25 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asn Asp His Phe
Glu

85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

30 100 105

<210> 48

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

5 Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Ser Tyr Phe
Val

20 25 30

10 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

35 40 45

Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser

15 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Gly Ile Ser Asn Phe
20 Tyr

85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105

<210> 49

25 <211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

30 Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Ser Tyr Phe

Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

5 35 40 45

Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
10 Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Ala Tyr Leu Gly Asp
Val

85 90 95

15 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105

<210> 50
<211> 112
<212> PRT

20 <213> Homo sapiens
<400> 50

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

1 5 10 15

25 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser
Asn

20 25 30

Tyr Val Ile Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
Leu

30 35 40 45

Ile Tyr Asp Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
Ser

50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 Gln
 65 70 75 80
 5 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Tyr Asp Asn Tyr
 Gln
 85 90 95
 Ala Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 Gln
 10 100 105 110
 <210> 51
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(110)
 <223> Idêntica à SEQ ID NO:32
 <400> 51
 20 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
 Val
 25 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
 Tyr
 35 40 45
 Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 30 Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala

Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Asn Tyr His Asp
Ser

5 85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

<210> 52

<211> 110

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1)..(110)

15 <223> Idêntica à SEQ ID NO:34

<400> 52

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

1 5 10 15

20 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

25 35 40 45

Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala

30 Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala His Tyr His Asp

Ile

85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

5 <210> 53

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1)..(114)

<223> Idêntica à SEQ ID NO:39

<400> 53

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

15 Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr

Gly

20 25 30

20 Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
Pro

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

Pro

25 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

Ile

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

30 Tyr

85 90 95

Ala Tyr Glu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

Lys

100

105

110

Arg Thr

5 <210> 54

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1)..(114)

<223> Idêntica à SEQ ID NO:40

<400> 54

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

15 Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
Gly

20 25 30

20 Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
Pro

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
Pro

25 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
Ile

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln

30 Tyr

85 90 95

Ala Phe Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

Lys

100

105

110

Arg Thr

5 <210> 55

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1)..(121)

<223> Idêntica à SEQ ID NO:65 e SEQ ID NO:66

<400> 55

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

15 Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly
Tyr

20 25 30

20 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Met

35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Trp Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys
Phe

25 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 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

30 Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp

Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

5 <210> 56

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1)..(121)

<223> Idêntica à SEQ ID NO:69 e SEQ ID NO:70

<400> 56

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

15 Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly

Tyr

20 20 25 30

20 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

Met

35 40 45

Gly Ile Ile Asp Pro Trp Asn Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Gln Lys

Phe

25 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 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

30 Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp

Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

5 <210> 57

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

10 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 Gly
Tyr

15 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Met

35 40 45

Gly Val Ile Asp Pro Trp Asn Gly Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Lys
Phe

20

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala
Tyr

65 70 75 80

25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp
Gly

30 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 58

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1)..(113)

<223> Idêntica à SEQ ID NO:67 e SEQ ID NO:68

<400> 58

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
Tyr

15 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asp Pro Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
Gln

20

50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met

65 70 75 80

25 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala

85 90 95

Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
Ser

30 100 105 110

Ser

<210> 59

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1)..(113)

<223> Idêntica à SEQ ID NO:71 e SEQ ID NO:72

<400> 59

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
Tyr

15 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asp Pro Ile Met Gly Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
Gln

20

50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met

65 70 75 80

25 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala

85 90 95

Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
Ser

30 100 105 110

Ser

<210> 60

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 60

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
10 Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Met

35 40 45

15 Gly Glu Ile Asp Pro Val Ile Gly Glu Thr Asp Tyr Ala Gln Lys
Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala
Tyr

20 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys

85 90 95

Ala Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
25 Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 61

30 <211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

1 5 10 15

5 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

10 35 40 45

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Phe Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
Leu

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
Ser

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys

85 90 95

20 Ala Arg Gly Tyr Glu Phe His Gly Tyr Thr Thr Phe Asp Tyr Trp
Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

25 <210> 62

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn
 Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 5 Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Phe Pro Asp Thr Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser
 Phe
 50 55 60
 10 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala
 Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 Cys
 15 85 90 95
 Ala Arg Val Lys Leu Ile Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 20 115
 <210> 63
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 63
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser
 30 Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu

Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Val Asn Asp Tyr
Ala

5 50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys
Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala
Val

10

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Ala Val Tyr Pro Gly Pro Tyr Gly
Phe

100 105 110

15 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 64

<211> 123

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 64

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

1 5 10 15

25 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn
Tyr

20 25 30

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

30 35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser
Phe

50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala
 Tyr
 65 70 75 80
 5 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 Cys
 85 90 95
 Ala Arg Met Ser Tyr Asp Tyr Gln His Gln Ala Pro Ser Met Asp
 Ser
 10 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 65
 <211> 121
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(121)
 20 <223> Idêntica à SEQ ID NO:55 e SEQ ID NO:66
 <400> 65
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ala
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly
 Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 30 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Pro Trp Thr Gly Asn Thr 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
 5 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp
 Gly
 10 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 66
 <211> 121
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(121)
 20 <223> Idêntica à SEQ ID NO:55 e SEQ ID NO:65
 <400> 66
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ala
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly
 Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 30 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Pro Trp Thr Gly Asn Thr 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
 5 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp
 Gly
 10 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 67
 <211> 113
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(113)
 20 <223> Idêntica à SEQ ID NO:58 e SEQ ID NO:68
 <400> 67
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ser
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
 Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 30 35 40 45
 Gly Gly Ile Asp Pro Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 Gln

50 55 60
 Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 Met
 65 70 75 80
 5 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala
 85 90 95
 Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 Ser
 10 100 105 110
 Ser

 <210> 68
 <211> 113
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(113)
 20 <223> Idêntica à SEQ ID NO:58 e SEQ ID NO:67
 <400> 68
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ser
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
 Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 30 35 40 45
 Gly Gly Ile Asp Pro Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 Gln

50 55 60
 Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 Met
 65 70 75 80
 5 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala
 85 90 95
 Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 Ser
 10 100 105 110
 Ser

 <210> 69
 <211> 121
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(121)
 20 <223> Idêntica à SEQ ID NO:56 e SEQ ID NO:70
 <400> 69
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ala
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly
 Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 30 35 40 45
 Gly Ile Ile Asp Pro Trp Asn Gly Gln Thr 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
 5 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp
 Gly
 10 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 70
 <211> 121
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(121)
 20 <223> Idêntica à SEQ ID NO:56 e SEQ ID NO:69
 <400> 70
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ala
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly
 Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 30 35 40 45
 Gly Ile Ile Asp Pro Trp Asn Gly Gln Thr 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
 5 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp
 Gly
 10 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 71
 <211> 113
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(113)
 20 <223> Idêntica à SEQ ID NO:59 e SEQ ID NO:72
 <400> 71
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ser
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
 Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 30 35 40 45
 Gly Gly Ile Asp Pro Ile Met Gly Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 Gln

50 55 60
 Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 Met
 65 70 75 80
 5 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala
 85 90 95
 Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 Ser
 10 100 105 110
 Ser

 <210> 72
 <211> 113
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1)..(113)
 20 <223> Idêntica à SEQ ID NO:59 e SEQ ID NO:71
 <400> 72

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ser
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
 Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 30 35 40 45
 Gly Gly Ile Asp Pro Ile Met Gly Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 Gln

50 55 60
 Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 Met
 65 70 75 80
 5 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala
 85 90 95
 Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 Ser
 10 100 105 110
 Ser

 <210> 73
 <211> 642
 15 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcg-
 tatc 60
 20 tcgtgtagcg gcgattctat tggtaataag tatgttcatt ggtaccagca gaa-
 acccggg 120
 caggcgccag ttcttgtgat ttatgctgat tctgatcgtc cctcaggcat cccgga-
 acgc 180
 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac
 25 tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg ccagtcttat gtcattatc atgatatttg
 ggtgtttggc 300
 ggcggcacga agttaaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcggc
 cactctgttc 360
 30 ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cata-
 agtgac 420
 ttctaccgga gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt ca-

aggcggga 480
 gtggagacca ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagc-
 tatctg 540
 agcctgacgc ctgagcagtg gaagtccac agaagctaca gctgccaggt cagc-
 5 catgaa 600
 gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt ca 642
 <210> 74
 <211> 660
 <212> DNA
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 74
 gatatcgtga tgaccagag cccgcatagc ctggcgggtga gcctggggcga acgtgc-
 gacc 60
 attaactgca gaagcagcca gtctattctt tatggtatta acaataattt
 15 tctggggttg 120
 taccagcaga aaccagggtca gccgccgaaa ctattaattt attgggcttc
 tactcgtgaa 180
 agcgggggtcc cggatcgttt tagcggctct ggatccggca ctgattttac cctgac-
 catt 240
 20 tcgtccctgc aagctgaaga cgtggcgggtg tattattgcc agcagtatgc ttat-
 gagcct 300
 aatacctttg gccagggtac gaaagttgaa attaaacgta cggtaggctgc ac-
 catctgtc 360
 ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt
 25 tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa
 cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac cta-
 cagcctc 540
 30 agcagcacc cgtacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta
 cgccctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg a-

gagtgttag 660

<210> 75

<211> 660

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 75

gatatcgtga tgaccagag cccggatagc ctggcgggtga gcctggggcga acgtgc-
gacc 60

10 attaaactgca gaagcagcca gtctattctt tatggtatta acaataattt
tctggggttg 120

taccagcaga aaccagggtca gccgccgaaa ctattaattt attgggcttc
tactcgtgaa 180

agcgggggtcc cggatcgttt tagcggctct ggatccggca ctgattttac cctgac-
catt 240

15 tcgtccctgc aagctgaaga cgtggcgggtg tattattgcc ttcagtattc tgat-
gagcct 300

tggacctttg gccagggtac gaaagttgaa attaaacgta cgggtggctgc ac-
catctgtc 360

20 ttcactttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt
tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa
cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac cta-
cagcctc 540

25 agcagcacc c tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta
cgctgcgaa 600

gtcaccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg a-
gagtgttag 660

<210> 76

30 <211> 657

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 76
 gatatcgtga tgacccagag cccggatagc ctggcgggtga gcctgggcca acgtgc-
 gacc 60
 attaactgca gaagcagcca gtctattctt tatggtatta acaataattt
 5 tctggggttg 120
 taccagcaga aaccagggtca gccgccgaaa ctattaattt attgggcttc
 tactcgtgaa 180
 agcgggggtcc cggatcgttt tagcggctct ggatccggca ctgattttac cctgac-
 catt 240
 10 tcgtccctgc aagctgaaga cgtggcgggtg tattattgcc agcagtatgc
 ttttggttg 300
 acctttggcc agggtagcaa agttgaaatt aaacgtacgg tggctgcacc
 atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt
 15 gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctcca-
 atcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcct-
 cagc 540
 20 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcga-
 agtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttag
 657
 <210> 77
 25 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 77
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 30 Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr

Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

5 35 40 45

Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser

50 55 60

10 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala His Tyr His Asp
Ile

85 90 95

15 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
Lys

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
Gln

20 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
Gly

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
25 Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
Ala

165 170 175

30 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 Val
 195 200 205
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 5 210
 <210> 78
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 78
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
 Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
 15 Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
 Tyr
 35 40 45
 20 Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 Glu
 25 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Asn Tyr His Asp
 Ser
 85 90 95
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 30 Lys
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu

Gln

115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
Gly

5 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
10 Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
Ser

180 185 190

15 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
Val

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

20 <210> 79

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

25 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
Val

30 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

35 40 45
 Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
 Ser
 50 55 60
 5 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
 Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Asn Tyr His Asp
 Ser
 10 85 90 95
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 Lys
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 15 Gln
 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 Gly
 130 135 140
 20 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 Ala
 25 165 170 175
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 30 Val
 195 200 205
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 80

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 80

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

1 5 10 15

10 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Asn Lys Tyr
Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr

15 35 40 45

Ala Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser

50 55 60

20 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala
Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala His Tyr His Asp
Ile

85 90 95

25 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
Lys

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
Gln

30 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
Gly

130 135 140
 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 Gly
 145 150 155 160
 5 Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 Ala
 165 170 175
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 Ser
 10 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 Val
 195 200 205
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 15 210
 <210> 81
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 81
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
 25 Gly
 20 25 30
 Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 Pro
 35 40 45
 30 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 5 Tyr
 85 90 95
 Ala Tyr Glu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 Lys
 100 105 110
 10 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
 15 130 135 140
 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
 20 Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 Glu
 180 185 190
 25 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
 30 <210> 82
 <211> 219
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

5 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
Gly

 20 25 30

Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
10 Pro

 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
Pro

 50 55 60

15 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
Ile

 65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln
Tyr

20 85 90 95

Ser Asp Glu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
Lys

 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
25 Glu

 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
Phe

 130 135 140

30 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
 5 Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 Ser
 195 200 205
 10 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 83
 <211> 218
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 Gly
 1 5 10 15
 20 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
 Gly
 20 25 30
 Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 Pro
 25 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 30 Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

Tyr
 85 90 95
 Ala Phe Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 Arg
 5 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 10 Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 Ser
 145 150 155 160
 15 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 Lys
 20 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 25 210 215
 <210> 84
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 84
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 Gly

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
 Gly
 20 25 30
 5 Ile Asn Asn Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 Pro
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 Pro
 10 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln
 15 Tyr
 85 90 95
 Ala Phe Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 Lys
 100 105 110
 20 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
 25 130 135 140
 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
 30 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

5

195

200

205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 85

<211> 1347

10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtaaaaaaac cgggcgcgag cgtgaa-
agtg 60

15

agctgcaaag cctccggata tacctttact ggttattata tgaattgggt ccgcca-
agcc 120

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcatt atcaatccgt ggactggcaa tacga-
attac 180

gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag

20

caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgt-
gaccc 300

ggttttttttt attatactcc ttctgatctt tggggccaag gcaccctgggt gacggt-
tagc 360

25

tcagcttcca ccaagggacc atccgtcttc ccctgggcgc cctgctccag gag-
cacctcc 420

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggt-
gacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt ccta-
cagtcc 540

30

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcac-
gaag 600

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggācaa ga-
gagttgag 660

tccaaatatg gtcccccatg cccatcatgc ccagcacctg agttcctggg gggac-
catca 720

5 gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac acttcatga tctcccgac ccct-
gaggtc 780

acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctgg-
tacgtg 840

gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacag-
10 cacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caag-
gagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcccg tcttccatcg agaaaaccat ctccaa-
agcc 1020

15 aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagat-
gacc 1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga
catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc
20 cgtgctggac 1200

tccgacggct ctttcttct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtgg-
caggag 1260

gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacaca-
gaag 1320

25 agcctctccc tgtctctggg taaatga 1347

<210> 86

<211> 1323

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30 <400> 86

caggtgcaat tggttcagtc tggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaa-
agtg 60

agctgcaaag cctccggagg cactttttct tcttatgcta tttcttgggt gcgcca-
 agcc 120
 cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggt attgatacta ttatgggtac tgag-
 tatgct 180
 5 cagaagtttc agggtcgggt gaccattacc gcggatgaaa gcaccagcac cgcgta-
 tatg 240
 gaactgagca gcctgcgtag cgaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tggt-
 tatcag 300
 gatgtttggg gccaaggcac cctggtgacg gttagctcag cttccaccaa gggac-
 10 catcc 360
 gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagccgc
 cctgggctgc 420
 ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acgggtgtcgt ggaactcagg cgccct-
 gacc 480
 15 agcggcggtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcag-
 cagc 540
 gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct acacctgcaa cgta-
 gatcac 600
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca aatatgggtcc cc-
 20 catgceca 660
 tcatgcccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtct tcctgttccc cccaaa-
 accc 720
 aaggacactc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacgt gcgtgggtggg ggacgt-
 gagc 780
 25 caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt gcata-
 atgcc 840
 aagacaaagc cgcggggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcct-
 cacc 900
 gtcttgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaa-
 30 aggc 960
 ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agagc-
 cacag 1020

gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accagggtcag cct-
gacctgc 1080

ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggg-
cagccg 1140

5 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt
cttcctctac 1200

agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga atgtcttctc
atgctccgtg 1260

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctggg-
10 taaa 1320

tga 1323

- <210> 87

<211> 1323

<212> DNA

15 <213> Homo sapiens

<400> 87

cagggtgcaat tggttcagtc tggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaa-
agtg 60

agctgcaaag cctccggagg cactttttct tcttatgcta tttcttgggt gcgcca-
20 agcc 120

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggt atcgatccgt ttggcactgc gaat-
tacgcg 180

cagaagtttc agggccgggt gaccattacc gcggatgaaa gcaccagcac cgcgta-
tatg 240

25 gaactgagca gcctgcgtag cgaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tggt-
tatcag 300

gatgtttggg gccaaggcac cctggtgacg gttagctcag ctccaccaa gggac-
catcc 360

gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagccgc

30 cctgggctgc 420

ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccct-
gacc 480

agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcag-
 cagc 540
 gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct acacctgcaa cgta-
 gatcac 600
 5 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca aatatggtec cc-
 catgcccc 660
 tcatgcccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtct tctgttccc cccaaa-
 accc 720
 aaggacactc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacgt gcgtgggtgg ggacgt-
 10 gage 780
 caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt gcata-
 atgcc 840
 aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcct-
 cacc 900
 15 gtcttgacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaa-
 aggc 960
 ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agagc-
 cacag 1020
 gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cct-
 20 gacctgc 1080
 ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggg-
 cagccg 1140
 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt
 cttcctctac 1200
 25 agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga atgtcttctc
 atgctccgtg 1260
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctggg-
 taaa 1320
 tga 1323
 30 <210> 88
 <211> 1323
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 88

caggtgcaat tgggttcagtc tggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaa-
agtg 60

5 agctgcaaag cctccggagg cactttttct tcttatgcta tttcttgggt gcgcca-
agcc 120

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggt atcgatccgt ttggcactgc gaat-
tacgcg 180

cagaagtttc agggccgggt gaccattacc gcggatgaaa gcaccagcac cgcgta-
10 tatg 240

gaactgagca gcctgcgtag cgaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tggt-
tatcag 300

gatgtttggg gccaaggcac cctggtgacg gttagctcag ctccaccaaa gggac-
catcc 360

15 gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagccgc
cctgggctgc 420

ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgcctt-
gacc 480

agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcag-
20 cagc 540

gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct acacctgcaa cgta-
gatcac 600

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca aatatgggcc cc-
catgccca 660

25 tcatgcccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtct tcctgttccc cccaaa-
acc 720

aaggacactc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacgt gcgtgggtgg ggacgt-
gagc 780

caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt gcata-
30 atgcc 840

aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcct-
cacc 900

gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaa-
 aggc 960

ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agagc-
 cacag 1020

5 gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cct-
 gacctgc 1080

ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggg-
 cagccg 1140

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt
 10 cttcctctac 1200

agcaggctaa ccggtggacaa gagcaggtgg caggagggga atgtcttctc
 atgctccgtg 1260

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctggg-
 taaa 1320

15 tga 1323

<210> 89
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 89

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 Gly

25 Tyr

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met

35 40 45

30 Gly Ile Ile Asn Pro Trp Thr Gly Asn Thr 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 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 5 Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp
 Gly
 100 105 110
 10 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 Ala
 15 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 20 Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 Val
 180 185 190
 25 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 Gly
 30 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 Ser

225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 Arg
 245 250 255
 5 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 Ala
 10 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 15 Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 Thr
 325 330 335
 20 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 Cys
 25 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 30 Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys

Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
Ala

5 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
Lys

435 440 445

<210> 90

10 <211> 440

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

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

15 Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
Tyr

20 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asp Pro Ile Met Gly Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
Gln

25 50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met

65 70 75 80

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

30 Ala

85 90 95

Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

Ser
 100 105 110
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
 Ser
 5 115 120 125
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 Asp
 130 135 140
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 10 Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 Tyr
 165 170 175
 15 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 Lys
 180 185 190
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 Asp
 20 195 200 205
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 Ala
 210 215 220
 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 25 Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 Val
 245 250 255
 30 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 Val
 260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 Gln
 275 280 285
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 5 Gln
 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 Gly
 305 310 315 320
 10 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 Pro
 325 330 335
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 Thr
 15 340 345 350
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 Ser
 355 360 365
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 20 Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 Tyr
 385 390 395 400
 25 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 Lys
 30 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 91

<211> 440

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 91

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser

10 Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Met

35 40 45

15 Gly Gly Ile Asp Pro Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
Gln

50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
Met

20 65 70 75 80

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala

85 90 95

Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

25 Ser

100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
Ser

115 120 125

30 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 5 Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 Lys
 180 185 190
 10 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 Asp
 195 200 205
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 Ala
 15 210 215 220
 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 Val
 245 250 255
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 Val
 260 265 270
 25 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 Gln
 275 280 285
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 Gln
 30 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 Gly

305 310 315 320
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 Pro
 325 330 335
 5 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 Thr
 340 345 350
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 Ser
 10 355 360 365
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 15 Tyr
 385 390 395 400
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 Phe
 405 410 415
 20 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 25 <210> 92
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 92
 30 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
 Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 5 Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asp Pro Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 Gln
 50 55 60
 10 Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 Met
 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala
 15 85 90 95
 Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 Ser
 100 105 110
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
 20 Ser
 115 120 125
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 Asp
 130 135 140
 25 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 Tyr
 30 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 Lys

	180	185	190	
	Thr	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val		
	Asp			
	195	200	205	
5	Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro			
	Ala			
	210	215	220	
	Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	Pro			
10	225	230	235	240
	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	Val			
	245	250	255	
	Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr			
15	Val			
	260	265	270	
	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	Gln			
	275	280	285	
20	Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	Gln			
	290	295	300	
	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	Gly			
25	305	310	315	320
	Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	Pro			
	325	330	335	
	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met			
30	Thr			
	340	345	350	
	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			

Ser

355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
Tyr

5 370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
Tyr

385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
10 Phe

405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
Lys

420 425 430

15 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440

<210> 93

<211> 448

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 93

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Met

30 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Trp Thr Gly Asn Thr 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
 5 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp
 Gly
 10 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 15 Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 Val
 145 150 155 160
 20 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 Val
 25 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 30 Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 Arg
 5 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 10 Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 Val
 290 295 300
 15 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 Thr
 20 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 25 Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 Ser
 370 375 380
 30 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 5 Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 Lys
 435 440 445
 10 <210> 94
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 94
 15 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly
 Tyr
 20 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asp Pro Trp Asn Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Gln Lys
 25 Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala
 Tyr
 65 70 75 80
 30 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp
 Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 5 Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 Ala

130 135 140

10 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 Ala

15 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 20 His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 Gly

210 215 220

25 Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 Arg

30 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 Pro

	260	265	270	
	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	Ala			
	275	280	285	
5	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	Val			
	290	295	300	
	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	Tyr			
10	305	310	315	320
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys			
	Thr			
	325	330	335	
	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
15	Leu			
	340	345	350	
	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	Cys			
	355	360	365	
20	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	Ser			
	370	375	380	
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
	Asp			
25	385	390	395	400
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys			
	Ser			
	405	410	415	
	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
30	Ala			
	420	425	430	
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			

Lys
 435 440 445
 <210> 95
 <211> 448
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 95
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ala
 10 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly
 Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 15 Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asp Pro Trp Asn Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Gln Lys
 Phe
 50 55 60
 20 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala
 Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys
 25 85 90 95
 Ala Arg Asp Pro Gly Phe Phe Tyr Tyr Thr Pro Ser Asp Leu Trp
 Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 30 Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
Val
5 145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
10 Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
His
195 200 205
15 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
Gly
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
Ser
20 225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
25 Pro
260 265 270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
Ala
275 280 285
30 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 5 Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 Leu
 340 345 350
 10 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 Ser
 15 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 20 Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 Ala
 420 425 430
 25 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 Lys
 435 440 445
 <210> 96
 <211> 440
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 96

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
 5 Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Met
 35 40 45
 10 Gly Gly Ile Asp Pro Ile Met Gly Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 Gln
 50 55 60
 Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 Met
 15 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala
 85 90 95
 Arg Val Tyr Gln Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 20 Ser
 100 105 110
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
 Ser
 115 120 125
 25 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 Asp
 130 135 140
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 Thr
 30 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 Tyr

		165		170		175									
		Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly Thr
		Lys													
		180		185		190									
5		Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys Val
		Asp													
		195		200		205									
		Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys Pro
		Ala													
10		210		215		220									
		Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro Lys
		Pro													
		225		230		235		240							
		Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys Val
15		Val													
		245		250		255									
		Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp Tyr
		Val													
		260		265		270									
20		Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu Glu
		Gln													
		275		280		285									
		Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu His
		Gln													
25		290		295		300									
		Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn Lys
		Gly													
		305		310		315		320							
		Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly Gln
30		Pro													
		325		330		335									
		Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu Met

Thr

340

345

350

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

5

355

360

365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
Tyr

370

375

380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
Tyr

10

385

390

395

400

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

405

410

415

15

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
Lys

420

425

430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435

440

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo humano ou humanizado isolado ou fragmento funcional do mesmo compreendendo uma região de ligação de antígeno que é específica para proteína alvo c-Met, em que o anticorpo ou fragmento funcional do mesmo liga a c-Met.

2. Anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo ou fragmento funcional do mesmo liga à proteína alvo c-Met com uma K_D de $2,0 \times 10^{-5}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-6}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-7}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-8}$ M ou menos, e $2,0 \times 10^{-9}$ M ou menos.

3. Anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo ou fragmento funcional do mesmo tem uma taxa fora (K_{fora}) para proteína alvo c-Met de $1,0 \times 10^{-2}$ por seg menor ou $1,0 \times 10^{-3}$ por seg ou menor 1×10^{-4} por seg ou menor ou $1,0 \times 10^{-5}$ por seg ou menor.

4. Anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo ou fragmento funcional do mesmo liga à proteína alvo c-Met com uma K_D de $2,0 \times 10^{-5}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-6}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-7}$ M ou menos, $2,0 \times 10^{-8}$ M ou menos, e $2,0 \times 10^{-9}$ M ou menos, e inibe HGF que liga c-Met.

5. Anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo ou fragmento funcional do mesmo liga à proteína alvo c-Met e modula fosforilação de c-Met.

6. Anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 5, em que a ativação da fosforilação de c-Met estimula pelo menos uma de uma atividade selecionada do grupo de regeneração de órgão, cura de ferida, e regeneração de tecido.

7. Anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 6, em que o órgão é selecionado do grupo de rim, fígado, pâncreas, coração, pulmão, intestino, pele, timo, e tireóide.

8. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que ligação do anticorpo a c-Met é determinada por pelo menos um ensaio selecionado

de uma quantidade de antagonismo ou agonismo de: indução de ligando de uma enzima de atividade da via de transdução de sinal de c-Met; indução de ligando de uma expressão do gene da via de transdução de sinal de c-Met; ligação com base em eletroquimiluminescência de um ligando a c-Met; ensaio imunoabsorvente ligado à enzima de ligação de um ligando a c-Met; e proliferação, sobrevivência, migração ou metástase de uma célula.

9. Região de ligação de antígeno isolada de um anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 1.

10. Seqüência de nucleotídeo isolada selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 1-30, 73-76, e 85-88.

11. Seqüência de aminoácido isolada codificada por uma seqüência de nucleotídeo de acordo com a reivindicação 10, e variantes conservadoras da seqüência de aminoácido.

12. Seqüência de nucleotídeo isolada de acordo com a reivindicação 10, em que cada uma das SEQ ID NOs: 1-20 codifica uma cadeia leve de ligação de antígeno.

13. Seqüência de nucleotídeo isolada de acordo com a reivindicação 10, em que cada uma das SEQ ID NOs: 21-30 codifica uma cadeia pesada de ligação de antígeno.

14. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma cadeia leve codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 1-20.

15. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 21-30.

16. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma cadeia leve codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 1-20, e uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 21-30.

17. Seqüência de aminoácido isolada selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 31-72, 77-84, e 89-96 e variantes conservadoras das mesmas.

18. Seqüência de aminoácido isolada de acordo com a reivindi-

cação 17, em que cada uma das SEQ ID NOs: 31-54 compreende uma cadeia leve de ligação de antígeno.

19. Seqüência de aminoácido isolada de acordo com a reivindicação 17, em que cada uma das SEQ ID NOs: 55-72 compreende uma cadeia pesada de ligação de antígeno.

20. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma cadeia leve tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 31-54.

21. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma cadeia pesada tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 55-72.

22. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma cadeia leve tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 31-54 e variantes conservadoras das mesmas, e uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 55-72 e variantes conservadoras das mesmas.

23. Seqüência de aminoácido isolada tendo pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade com as SEQ ID NOs: 31-72, 77-84, e 89-96.

24. Seqüência de nucleotídeo isolada tendo pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade com uma seqüência descrita nas SEQ ID NOs: 1-30, 73-76, e 85-88.

25. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma cadeia leve de Ig lambda codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo da SEQ ID NO: 73.

26. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma cadeia leve de Ig capa codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 74-76.

27. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma cadeia leve de Ig lambda como mostrada em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo da SEQ ID NO: 77-80,

28. Região de ligação de antígeno isolada compreendendo uma

cadeia leve de Ig capa como mostrada em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 81-84.

29. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1 que é uma IgG.

5 30. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 29 que é uma IgG1, um IgG2, um IgG3 ou um IgG4.

31. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 30, em que a IgG4 é codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 85-88.

10 32. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 31, em que a IgG4 é codificada por uma seqüência de nucleotídeo tendo pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade com uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 85-88.

15 33. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 30, em que a IgG4 como mostrada em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 89-96 e variantes conservadoras das mesmas.

20 34. Anticorpo humano ou humanizado isolado ou fragmento funcional do mesmo, compreendendo uma região de ligação de antígeno que é específica para um epítipo de c-Met, em que o anticorpo ou fragmento funcional liga a receptores de superfície de c-Met em uma célula, e impede ou melhora desenvolvimento ou metástase de um câncer ou impede ou melhora uma condição inflamatória.

25 35. Anticorpo isolado ou fragmento funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-34 que é um fragmento de anticorpo de Fab ou scFv.

36. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 35 que é uma IgG.

30 37. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 36 que é uma IgG1, uma IgG2, uma IgG3 ou uma IgG4.

38. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 37, em que a IgG4 é codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo

que consiste nas SEQ ID NOs: 85-88.

39. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 38, em que a IgG4 é codificada por uma seqüência de nucleotídeo tendo pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade com uma seqüência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 85-88.

40. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 37, em que a IgG4 compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 89-96 e variantes conservadoras das mesmas.

41. Anticorpo isolado ou fragmento funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-34, que é um fragmento de Fab ou fragmento de anticorpo de scFv ou um nanocorpo de camelídeo.

42. Anticorpo isolado ou fragmento funcional do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-41, em que o epítopo é um epítopo conformacional.

43. Epítopo de acordo com a reivindicação 42, em que o epítopo compreende resíduos de uma seqüência de aminoácido de um domínio extracelular de c-Met.

44. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo ou fragmento funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-42 e um veículo farmacêuticamente aceitável ou excipiente deste.

45. Animal transgênico portando um gene que codifica um anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-42.

46. Método para tratar um distúrbio ou condição relacionada a c-Met, compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 44.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o distúrbio ou condição é um câncer ou condição inflamatória.

48. Método de acordo com a reivindicação 47, em que o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de cérebro, câncer de estô-

mago, câncer genital, câncer urinário, câncer de próstata, câncer de bexiga (superficial e invasivo muscular), câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, câncer colorretal, glioma (incluindo glioblastoma, astrocitoma anaplástico, oligoastrocitoma, oligodendroglioma), câncer esofágico, câncer gástrico, câncer gastrointestinal, câncer de fígado, carcinoma hepatocelular (HCC) incluindo HCC de infância, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço, carcinoma nasofaríngeo), carcinoma de célula de Hurthle, câncer epitelial, câncer de pele, melanoma incluindo melanoma maligno, mesotelioma, linfoma, mieloma incluindo mieloma múltiplo, leucemias, câncer de pulmão incluindo câncer de pulmão de célula não-pequena (incluindo todos os subtipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa, carcinoma broncoalveolar, carcinoma de célula grande, e tipo adenoescamoso misturado), câncer de pulmão de célula pequena, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer de próstata, câncer de rim, câncer de célula renal incluindo câncer de célula renal papilar hereditário e esporádico, Tipo I e Tipo II, e câncer de célula renal de célula clara; sarcomas, em particular osteossarcoma, sarcomas de célula clara, e sarcomas de tecido macio (incluindo rabdomiossarcomas alveolares e embrionários, sarcomas alveolares de parte macia); carcinoma de

20 tiróide (papilares e outros subtipos).

49. Método de acordo com a reivindicação 48, em que o câncer é selecionado do grupo de cânceres que consistem em fígado e esofágico.

50. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o método adicionalmente compreende administrar um agente quimioterapêutico.

25 51. Método de acordo com a reivindicação 50, em que o agente quimioterapêutico é um agente anticâncer.

52. Método para tratar uma célula indesejada compreendendo contatar a célula com um anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-42.

30 53. Método de acordo com a reivindicação 52, em que a célula porta c-Met.

54. Método de acordo com a reivindicação 52 ou 53, adicional-

mente compreendendo tratar a célula com um agente quimioterapêutico ou radiação.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 46-54, em que seguindo a administração ou contato, o método adicionalmente
5 compreende observar a melhora ou retardamento do desenvolvimento ou metástase do câncer.

56. Método para identificar uma célula compreendendo c-Met, o método compreendendo contatar a célula com um anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-42, em que o
10 anticorpo ou fragmento adicionalmente compreende uma marcação detectável.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, em que a marcação é radioativa, fluorescente, magnética, paramagnética, ou quimioluminescente.

58. Método de acordo com a reivindicação 56, adicionalmente compreendendo uma etapa de imagear ou separar a célula.

59. Anticorpo humano ou humanizado ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-42, em que o anticorpo é um anticorpo sintético.

60. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 44, adicionalmente compreendendo um agente terapêutico adicional.

61. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 60, em que o agente terapêutico adicional é selecionado do grupo que consiste em um agente anticâncer; um antibiótico; um agente antiinflamatório; um
25 fator de crescimento; e uma citocina.

62. Anticorpo isolado compreendendo uma primeira seqüência de aminoácido que é uma cadeia pesada selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 55-72, e seqüência tendo pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cento de identidade de seqüência com uma seqüência selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 55-72; e uma segunda seqüência de aminoácido que é uma cadeia leve selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID
30 NOs: 31-54, e seqüência tendo pelo menos 60, 70, 80, 90, 95 ou 99 por cen-

to de identidade de seqüência com uma seqüência selecionada do grupo das SEQ ID NOs: 31-54.

5 63. Imunoconjugado compreendendo um primeiro componente que é um anticorpo ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-42.

64. Imunoconjugado de acordo com a reivindicação 63, compreendendo um segundo componente tendo uma segunda seqüência de aminoácido.

10 65. Imunoconjugado de acordo com a reivindicação 64, adicionalmente compreendendo uma citotoxina.

66. Imunoconjugado de acordo com a reivindicação 64, em que a segunda seqüência é uma proteína ligadora ou anticorpo tendo uma especificidade de ligação para um alvo que é diferente de c-Met.

15 67. Anticorpo biespecífico de acordo com a reivindicação 64.

68. Anticorpo biespecífico de acordo com a reivindicação 67, em que o alvo da especificidade de ligação diferente de c-Met é um antígeno de tumor ou proteína associada ao tumor em uma superfície de uma célula de câncer.

20 69. Kit compreendendo um anticorpo ou fragmento do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-42.

70. Kit de acordo com a reivindicação 69, adicionalmente compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável ou excipiente deste.

25 71. Kit de acordo com a reivindicação 69, em que o anticorpo está presente em uma dose de unidade e adicionalmente compreendendo instruções para o uso na administração a um sujeito.

VH

	Estrutura 1																				CDR1																	
Posição	1										2										3																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	a	b	2	3	4	5	
	MfeI										BspEI																											
VH1A	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	G	T	F	S	S	-	-	Y	A	I	S	
4687	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	G	T	F	S	S	-	-	Y	A	I	S	
5081	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	G	T	F	S	S	-	-	Y	A	I	S	
5082	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	G	T	F	S	S	-	-	Y	A	I	S	
VH1B	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	-	-	Y	Y	M	H	
4536	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	-	-	Y	Y	M	N	
5078	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	-	-	Y	Y	M	N	
5079	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	-	-	Y	Y	M	N	
VH4	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	G	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	S	-	-	Y	Y	M	S	
4541	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	G	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	S	S	S	V	Y	W	N	
VH5	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	T	S	-	-	Y	Y	M	I	G
4537	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	S	N	-	-	Y	Y	M	I	G
4682	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	T	N	-	-	Y	Y	M	I	G
VH6	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	A	I	S	G	D	S	V	S	S	N	S	A	A	W	N	
4690	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	A	I	S	G	D	S	V	S	S	N	S	A	A	W	N	

Estrutura 2										CDR 2																																							
4										5										6										7																			
6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	a	b	c	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6						
BstXI										XhoI																				BstEII										BstBI									
W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	D	P	-	-	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	E	S	T	S						
W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	D	P	-	-	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	E	S	T	S						
W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	D	P	-	-	I	M	G	T	E	V	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	E	S	T	S							
W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	E	I	D	P	-	-	V	I	G	E	T	D	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	E	S	T	S						
W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	N	P	-	-	N	S	G	G	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	S						
W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	I	I	N	P	-	-	W	T	G	N	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	S						
W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	I	I	D	R	-	-	W	N	G	Q	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	S						
W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	V	I	D	P	-	-	W	N	G	I	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	S						
W	I	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	-	-	-	Y	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N						
W	I	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	G	E	I	Y	-	-	-	F	G	W	T	Y	N	P	S	L	K	G	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N								
W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	I	I	Y	P	-	-	G	D	S	D	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	S						
W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	P	I	F	P	-	-	D	T	S	Y	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	S						
W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	I	I	Y	P	-	-	S	D	S	Y	T	N	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	S						
W	I	R	Q	S	P	G	R	G	L	E	W	L	G	R	I	Y	Y	R	-	-	S	K	W	N	D	V	A	U	S	V	K	S	R	I	T	I	N	P	D	T	S	K	N						
W	I	R	Q	S	P	G	R	G	L	E	W	L	G	R	I	Y	Y	R	-	-	S	K	W	N	D	V	A	U	S	V	K	S	R	I	T	I	N	P	D	T	S	K	N						

FIG. 1A

Estrutura 3																								CDR 3																							
8												9												10																							
7	8	9	0	1	2	a	b	c	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	1	2									
												EagI												BssHII																							
:	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
:	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	V	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	D	V						
:	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	V	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	D	V						
:	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	V	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	D	V						
:	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
:	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	D	P	G	F	F	Y	T	P	-	-	-	-	-	S	D	L						
:	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	D	P	G	F	F	Y	T	P	-	-	-	-	-	S	D	L						
:	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	D	P	G	F	F	Y	T	P	-	-	-	-	-	S	D	L						
I	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
I	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	G	Y	E	F	H	G	V	T	T	-	-	-	-	-	P	D	V					
:	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y		Y		C	A	R	:	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
:	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y		Y		C	A	R	:	V	K	L	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D	V							
:	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y		Y		C	A	R	:	M	S	V	D	Y	Q	H	Q	A	P	S	-	-	-	M	D	S						
I	Q	F	S	L	Q	L	N	S	V	T	P	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
I	Q	F	S	L	Q	L	N	S	V	T	P	E	D	:	T	A	V		Y	Y		C	A	R	:	Q	G	A	V	Y	P	G	P	Y	G	-	-	-	-	P	D	V					

Estrutura 4																							
												11											
3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3		3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	
SlyI												BspI											
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V		S	S										
W	G		Q	G		T	L	V	T	V													

FIG. 1B

V Lambda

		Estrutura 1																								CDR 1															
		1												2												3															
Posição		EcoRV												SexA												BssSI															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	a	b	c	d	e	f	1	2	3	4
VL1		D	I	V	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	G	A	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N	I	G	S	.	.	.	.	N	Y	V	S	
4682		D	I	V	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	G	A	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N	I	G	S	.	.	.	.	N	Y	V	S	
VL3		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	A	L	G	D	.	.	.	.	K	Y	V	H		
4536		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	S	I	G	N	.	.	.	.	K	Y	V	H		
5087		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	S	I	G	N	.	.	.	.	K	Y	V	H		
5088		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	S	I	G	N	.	.	.	.	K	Y	V	H		
5091		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	S	I	G	N	.	.	.	.	K	Y	V	H		
5092		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	S	I	G	N	.	.	.	.	K	Y	V	H		
4537		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	S	L	R	S	.	.	.	.	Y	F	V	S		
5102		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	S	L	R	S	.	.	.	.	Y	F	V	S		
5105		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	S	L	R	S	.	.	.	.	Y	F	V	S		
4541		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	N	I	G	S	.	.	.	.	Y	Y	V	Y		
5093		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	N	I	G	S	.	.	.	.	Y	Y	V	Y		
5094		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	N	I	G	S	.	.	.	.	Y	Y	V	Y		
5095		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	N	I	G	S	.	.	.	.	Y	Y	V	Y		
4690		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	K	L	G	S	.	.	.	.	Y	F	V	Y		
5106		D	I	E	L	T	Q	P	P	.	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	K	L	G	S	.	.	.	.	Y	F	V	Y		

CDR 2										Estrutura 3																																							
										5							6							7							8																		
										0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8											
										Bsu36I							BamHI							BbsI																									
										D	N	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	T	G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	T	N	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	T	G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										A	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										A	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										A	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										A	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	D	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	D	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	D	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
										D	D	D	D	N	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C
										D	D	D	D	N	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C

FIG. 2A

Estrutura 2																CDR 2	Estrutura 3																								
4								5								6								7																	
1	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6									
KpnI								XmaI								BbeI								Bsu36I								BamHI									
W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D	N	N	O	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	T
W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D	D	T	N	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	T	S	A	S	L	A	I	T
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	A	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	A	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	A	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	A	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	D	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	D	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	D	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S
W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	N	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S

Estrutura 4																CDR 3	Estrutura 4																						
8								9								10																							
7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																	
BbsI																								HpaI								MscI							
G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	R	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	S	T	Y	D	N	Y	Q	A	G	W		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	R	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	Y	D	S	S	M	L	-	R		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	S	Y	A	N	Y	H	D	S	W		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	S	Y	A	S	D	Y	T	S	W		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	S	Y	A	H	Y	H	D	I	W		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	H	D	S	L	Y	S	-	R		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	S	W	D	T	L	S	D	V	E		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	S	W	D	P	P	S	A	F	E		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	S	W	D	N	D	-	H	F	E		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	S	Y	D	F	P	S	-	-	I		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	S	Y	D	S	Y	I	-	-	F		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	S	T	Y	D	A	F	T	-	-	F		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	S	Y	D	K	Y	V	-	-	F		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	S	F	G	I	S	N	F	-	Y		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				
G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	G	S	W	A	Y	L	G	-	-	D		V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q				

FIG. 2B

Vkappa

Estrutura 1																					CDR 1																			
Posição																																								
1										2										3																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	1	2	3	4											
EcoRV										BamII										PstI																				
VK4	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	N	K	N	Y	L	A
4687	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	S	Q	S	I	L	Y	G	I	N	N	-	N	F	L	G
5097	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	S	Q	S	I	L	Y	G	I	N	N	-	N	F	L	G
5098	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	S	Q	S	I	L	Y	G	I	N	N	-	N	F	L	G
5100	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	S	Q	S	I	L	Y	G	I	N	N	-	N	F	L	G
5101	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	S	Q	S	I	L	Y	G	I	N	N	-	N	F	L	G

Estrutura 2										CDR 2										Estrutura 3																			
4										5										6										7									
5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5									
KpnI					SexAI					AseI					SmaI					BamHI																			
WY	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I
WY	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I
WY	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I
WY	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I
WY	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I
WY	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I

										CDR 3										Estrutura 4															
8										9										10															
6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	a	b	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BbsI										MscI										BsiWI															
SSLQA	E	D	V	A	V	Y	Y	C	X	X	X	X	X	X	-	-	X	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T					
SSLQA	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	N	H	P	-	-	H	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T				
SSLQA	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	A	F	G	-	-	-	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T				
SSLQA	E	D	V	A	V	Y	Y	C	L	Q	Y	S	D	E	P	-	-	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T				
SSLQA	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	A	Y	E	P	-	-	N	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T				
SSLQA	E	D	V	A	V	Y	Y	C	L	Q	Y	A	F	S	P	-	-	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T				

FIG. 3

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO PARA ANTICORPOS DE C-MET"**.

- 5 Anticorpos e fragmentos que ligam à proteína alvo c-Met, particularmente a epítomos localizados no domínio extracelular de c-Met, são fornecidos, como adicionalmente métodos de uso dos anticorpos e kits, para tratar uma célula indesejada, em particular, uma célula associada a uma condição relacionada a c-Met tal como um câncer, uma metástase, ou uma condição inflamatória.