

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

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/70 (2014.01) **A61K 39/395** (2014.01)
A61K 38/16 (2014.01) **C07K 14/00** (2014.01)
C07K 16/00 (2014.01) **C07H 21/00** (2014.01)
C07K 16/28 (2014.01) **C12N 15/13** (2014.01)
C12N 5/20 (2014.01) **A61P 25/00** (2014.01)

(22) Data de pedido: **2008.01.09**

(30) Prioridade(s): **2007.01.09 US 879324 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.06.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.03.12**
117/2014

(73) Titular(es):

BIOGEN IDEC MA INC.
14 CAMBRIDGE CENTER CAMBRIDGE, MA
02142 US

(72) Inventor(es):

SHA MI US
STEVEN DONALD MIKLASZ US
BLAKE R. PEPINSKY US
ZHAOHUI SHAO US
ELLEN A. GARBER US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS SP35 E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

ENDÓGENO SP35 É UM REGULADOR NEGATIVO PARA A SOBREVIVÊNCIA NEURONAL, A REGENERAÇÃO DO AXÔNIO, A DIFERENCIAÇÃO DE OLIGODENDRÓCITOS E MIELINIZAÇÃO. AS MOLÉCULAS QUE BLOQUEIAM A FUNÇÃO DE SP35 ENDÓGENA, TAIS ANTICORPOS ANTI-SP35 PODEM SER UTILIZADOS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS PARA O TRATAMENTO DE DISFUNÇÃO DE OLIGODENDRÓCITOS E NEURÓNIOS. A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA SP35, E MÉTODOS PARA A UTILIZAÇÃO DESSES ANTICORPOS COMO ANTAGONISTAS DA FUNÇÃO DO ENDÓGENO SP35. O INVENTO PROPORCIONA AINDA ANTICORPOS ESPECÍFICOS DE HIBRIDOMA E DE FAGOS DERIVADA DE BIBLIOTECA MONOCLONAIAS, ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM ESSES ANTICORPOS, E VECTORES E CÉLULAS HOSPEDEIRAS QUE COMPREENDEM ESTES ANTICORPOS. O INVENTO PROPORCIONA AINDA MÉTODOS DE PROMOVER A SOBREVIVÊNCIA DE OLIGODENDRÓCITOS E MIELINIZAÇÃO NUM VERTEBRADO, COMPREENDENDO A ADMINISTRAÇÃO A UM VERTEBRADO EM NECESSIDADE DE TAL TRATAMENTO DE UMA QUANTIDADE EFICAZ DE UM ANTICORPO ANTI-SP35.

DESCRIÇÃO
ANTICORPOS SP35 E SUAS UTILIZAÇÕES

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

Esta invenção refere-se a neurologia, neurobiologia e biologia molecular. Mais particularmente, esta invenção refere-se a anticorpos SP35, assim como aos referidos anticorpos para utilização no tratamento de lesões, distúrbios e doenças neurológicas tais como lesões na espinal-medula.

Antecedentes da Invenção

Os axónios e as dendrites estendem-se dos neurónios. A extremidade distal de um axónio ou de uma neurite que se estende inclui uma região especializada, conhecida como o cone de crescimento. Os cones de crescimento sentem o ambiente local e guiam o crescimento dos axónios em direcção a uma célula alvo de um neurónio. Os cones de crescimento respondem a estímulos ambientais, por exemplo, adesividade de superfícies, factores de crescimento, neurotransmissores e campos eléctricos. Os cones de crescimento geralmente avançam a uma velocidade de um a dois milímetros por dia. O cone de crescimento explora a área à sua frente e em ambos os lados, por intermédio de alongamentos classificadas como lamellipodia e filopodia. Quando um alongamento contacta com uma superfície desfavorável, retira-se. Quando um alongamento contacta com uma superfície de crescimento favorável, continua a se estender e guia o cone de crescimento naquela direcção. Quando o cone de crescimento atinge uma célula alvo apropriada, é criada uma ligação sináptica.

A função das células nervosas é influenciada pelo contacto entre neurónios e outras células no seu ambiente circundante imediato (Rutishauser, et al., 1988, *Physiol. Rev.* 68: 819). Estas células incluem células gliais especializadas, oligodendrócitos no sistema nervoso central (SNC), e células de Schwann no sistema nervoso periférico (PNS), que reveste o axónio neuronal com mielina (Lemke, 1992, em *An Introduction to Molecular Neurobiology*, Z. Hall, Ed., p. 281, Sinauer).

Neurónios do SNC têm o potencial inerente de se regenerarem após uma lesão, mas são inibidos de o fazerem por intermédio de proteínas inibidores presentes na mielina (Brittis et al., 2001, *Neuron* 30: 11-14; Jones et al., 2002, *J. Neurosci.* 22: 2792-2803; Grimpe et al., 2002, *J. Neurosci.* 22: 3144-3160).

Foram caracterizadas várias proteínas inibidoras da mielina encontradas em oligodendrócitos. Exemplos conhecidos de proteínas inibidoras da mielina incluem NogoA (Chen et al., *Nature*, 2000, 403, 434-439; Grandpre et al., *Nature* 2000, 403, 439-444), glicoproteína associada à mielina (MAG) (McKerracher et al., 1994, *Neuron* 13: 805-811; Mukhopadhyay et al., 1994, *Neuron* 13: 757-767) e glicoproteína de oligodendrócito (OM-gp), Mikol et al., 1988, *J. Cell. Biol.* 106: 1273-1279). Verificou-se separadamente que cada uma destas proteínas era um ligando para o receptor neuronal Nogo-1 (NgR1 (Wang et al., *Nature* 2002, 417, 941-944; Grandpre et al., *Nature* 2000, 403, 439-444; Chen et al., *Nature*, 2000, 403, 434-439; Domeniconi et al., neurónio 2002, publicado na internet a 28 de Junho de 2002).

O receptor Nogo-1 (NgR1) é uma proteína de membrana ancorada a GPI que contém 8 repetições ricas em leucina (Fournier et al., 2001, *Nature* 409: 341-346). Aquando da interacção com proteínas inibidoras (por exemplo, NogoA, MAG e OM-gp), o

complexo NgR1 faz a transdução de sinais que conduzem ao colapso do cone de crescimento e à inibição do crescimento da neurite.

Existe uma necessidade não satisfeita para moléculas e métodos para a inibição do colapso do cone de crescimento mediado por NgR1 e da resultante inibição do crescimento da neurite. Adicionalmente existe uma necessidade para moléculas que aumentam a sobrevivência neuronal e a regeneração dos axónios. Particularmente para o tratamento de lesões, distúrbios ou doenças que envolvam lesões dos axónios, morte de células neuronais ou de oligodendrócitos, demielinação ou dimielinação ou que geralmente estão relacionadas com o sistema nervoso.

Tais lesões, distúrbios ou doenças incluem, mas não se limitam a, esclerose múltipla (MS), leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), encefalomielite (EPL), mileinose centropôntica (CPM), adrenoleucodistrofia, doença de Alexander, doença de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), leucodistrofia da célula globóide (doença de Krabbe) e degeneração Walleriana, neurite óptica, mielite transversa, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, lesões da espinal-medula, lesões traumáticas do cérebro, lesões pós radiação, complicações neurológicas da quimioterapia, acidente vascular, neuropatia óptica isquémica aguda, deficiência em vitamina E, síndrome da deficiência em vitamina E isolada, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia trigeminal, e paralisia de Bell. Entre estas doenças, a MS é a mais disseminada, afectando aproximadamente 2,5 milhões de pessoas globalmente.

A MS geralmente inicia-se com um padrão de recaída-remissão do envolvimento neurológico, que então progride para uma fase crónica com danos neurológicos crescentes. A MS está associada à destruição da mielina, de oligodendrócitos e de axónios localizados em lesões crónicas. A demielinação observada em MS não é sempre permanente e a remielinização foi documentada em fases iniciais da doença. A remielinização de neurónios requer oligodendrócitos.

Estão disponíveis vários tratamentos que modificam a doença para MS, incluindo a utilização de corticoesteróides e imunomoduladores tais como interferão beta e Tysabri®. Além disso, devido ao papel central dos oligodendrócitos e da mielinização em MS, têm havido esforços para o desenvolvimento de terapias para aumentar os números de oligodendrócitos ou para aumentar a mielinização. Ver, por exemplo, Cohen *et al.*, Pat. E.U.A. No. 5,574,009; Chang *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 346: 165-73 (2002). A WO 2007/008547 descreve anticorpos específicos para Sp35, e métodos para a utilização de tais anticorpos com antagonistas da função Sp35 endógena. No entanto, subsiste uma necessidade urgente em desenvolver terapias adicionais para MS e outros distúrbios de demielinação e dismielinização.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente divulgação baseia-se na descoberta de que Sp35 (Sp35 é também designada na literatura como LINGO-1 e LRRN6) é expressa em oligodendrócitos e células neuronais e regula negativamente a diferenciação oligodendrócito/neuronal, sobrevivência e mielinização dos axónios. Além disso, certos antagonistas de Sp35 promovem a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação de oligodendrócitos e de células neuronais, assim como a mielinização de neurónios. Com base nestas descobertas, a divulgação, que inclui a presente invenção,

refere-se geralmente to anticorpos, fragmento de ligação a um antigénio ou seus derivados que podem ser usados como um antagonista de Sp35.

Mais particularmente, a presente invenção proporciona um anticorpo ou um seu fragmento de ligação a um antigénio que se pode ligar especificamente a um polipéptideo Sp35 em que o anticorpo ou o seu fragmento compreende:

uma região VH que compreende as sequências VH CDR1, CDR2 e CDR3 da SEQ ID NO: 436, SEQ ID NO: 437, e SEQ ID NO: 438 respectivamente, e

a região VL que compreende as sequências VL CDR1 CDR2 e CDR3 da SEQ ID No 442, SEQ ID No 443 e SEQ ID NO 444 respectivamente

em que o anticorpo dos seus fragmentos liga com o polipéptideo Sp35 com uma afinidade caracterizada por uma constante diassociação não superior a 5×10^{-10} M como medido usando FACS em células CHO estavelmente transfectadas com Sp35 humano.

Aspectos e realizações adicionais da invenção são apresentados nas reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

FIG. 1: Gel de SDS-PAGE apresentando a imunoprecipitação de Sp35 por anticorpos monoclonais 1A7 e 2F3.

FIG. 2: Resultado de FACS mostrando que os MAbs 1A7 e 2F3 se ligaram a células COS-7 ou 293 que expressam Sp35, mas não controlam células sem expressão Sp35.

FIG. 3: MAbs 1A7 e 2F3 protegeram os neurónios DRG da inibição do crescimento das neurites mediada pela mielina.

FIG. 4A-G: Coloração imuno-histoquímica ("IHC") de co-culturas de neurónios DRG e oligodendrócitos tratados com anticorpos monoclonais 1A7 e 2F3, ou anticorpo de controlo. Os painéis D e E são ampliações, respectivamente, dos painéis B e C. A coloração com o anticorpo anti- β III-tubulina para identificar axónios, ou anticorpo anti-MBP para identificar oligodendrócitos. F: Quantificação de células MBP+ mielinantes aquando do tratamento de co-culturas com 1A7 ou 2F3. G: Análise por "Western blot" para quantificar as MBP produzidas a partir de co-culturas de neurónios DRG e de oligodendrócitos tratados com anticorpos monoclonais 1A7 e 2F3.

FIG. 5A-C: A: Coloração com anticorpo CC1 de oligodendrócitos de ratinho em modelo cuprizona. B. Coloração com anticorpo anti-proteína MBP ou com luxol fast blue de neurónios de ratinho em modelo cuprizona. C: Quantificação de oligodendrócitos positivos para o anticorpo CC1 às quatro semanas e às 6 semanas.

FIG. 6: Sobrevivência de RGCs. tratamento com anticorpo monoclonal 1A7. Animais tratados com o anticorpo 1A7 anti-Sp35 apresentaram uma sobrevivência neuronal significativa (80%) quando comparados com animais tratados com o anticorpo controlo ou com PBS, que apenas apresentaram uma sobrevivência neuronal de aproximadamente 50%.

FIG. 7. Pontuações BBB de ratinhos que recebem o anticorpo 1A7 anti-Sp35 após lesão da espinal-medula tal como descrito no exemplo 8.

FIG. 8. "Western blot" oligodendrócitos e DRGs co-cultivadas após incubação com anticorpos anti-Sp35 Li05, Li06 e 3, 10 e 30 mg de Sp35-Fc (LINGO-1-Ig) tal como descrito no exemplo 9.

FIG. 9. Fotografias dos nervos ópticos de A) Ratos Normais; B) ratos com Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) induzida pela Glicoproteína de Oligodendrócito da Mielina (MOG); e C) ratos com Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) induzida pela Glicoproteína de Oligodendrócito da Mielina (MOG) tratados com o Anticorpo 1A7 Sp35. Micrografias electrónicas de cada nervo óptico são apresentadas abaixo de cada fotografia do nervo óptico.

FIG. 10. Gráfico do número de fibras neuronais regenerativas por secção contadas em animais que receberam uma injeção no vítreo do anticorpo 1A7 Sp35 após esmagamento do nervo óptico.

FIG. 11. Resultados das FACS que mostram que os MABs 3B5.2 (3B5) e 7P1D5.1G9 (1D5) ligado às células CHO estavelmente transfectadas com Sp35 (LINGO-1).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. DEFINIÇÕES

Deve notar-se que o termo "uma" entidade refere-se a uma ou mais dessa entidade; por exemplo, por "um anticorpo Sp35," entende-se representar um ou mais anticorpos Sp35. Como tal, os termos "um", "um ou mais," e "pelo menos um" podem aqui ser usados sem distinção.

Tal como aqui utilizado, pretende-se que o termo "polipéptido" abranja o singular "polipéptido" assim como o plural "polipéptidos", e refere-se a uma molécula composta

por monómeros (aminoácidos) ligados linearmente através de ligações amida (também conhecidas como ligações peptídicas). O termo “polipéptido” refere-se a qualquer cadeia ou cadeias de dois ou mais aminoácidos, e não se refere a um comprimento específico do produto. Assim, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, “proteína”, “cadeia de aminoácidos”, ou qualquer outro termo usado para referir uma ou mais cadeias de dois ou mais aminoácidos, são incluídos no âmbito da definição de “polipéptido,” e o termo “polipéptido” pode ser usado em vez de, ou sem qualquer distinção relativamente a qualquer um destes termos. O termo “polipéptido” também pretende referir-se aos produtos de modificações pós-expressão do polipéptido, incluindo sem limitação glicosilação, acetilação, fosforilação, amidação, derivatização através de grupos de protecção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ou modificação por aminoácidos que não ocorrem naturalmente. Um polipéptido pode ser derivado de uma fonte biológica natural ou produzido por uma tecnologia recombinante, mas não é necessariamente traduzido de uma sequência de ácido nucleico designada. Pode ser gerado de qualquer modo, incluindo por síntese química.

Um polipéptido da divulgação pode ter um comprimento de cerca de 3 ou mais, 5 ou mais, 10 ou mais, 20 ou mais, 25 ou mais, 50 ou mais, 75 ou mais, 100 ou mais, 200 ou mais, 500 ou mais, 1000 ou mais, ou 2000 ou mais aminoácidos. Polipéptidos podem ter uma estrutura tridimensional definida, apesar de não terem necessariamente tal estrutura. Polipéptidos com uma estrutura tridimensional definida são referidos como enrolados, e polipéptidos que não possuem uma estrutura tridimensional definida, mas que podem alternativamente adoptar um grande número de conformações diferentes e são referidos como não enrolados. Tal como aqui utilizado, o termo glicoproteína refere-se a uma proteína acoplada a pelo

menos uma porção de hidrato de carbono que está ligada à proteína através de uma cadeia lateral contendo oxigénio ou de uma cadeia lateral contendo azoto de um resíduo de aminoácido, por exemplo, um resíduo serina ou um resíduo asparagina.

Por um polipéptido ou um fragmento, uma variante, ou um seu derivado "isolado" pretende-se referir um polipéptido que não está no seu meio natural. Não é necessário nenhum nível particular de purificação. Por exemplo, um polipéptido isolado pode ser removido do seu ambiente nativo ou natural. Polipéptidos produzidos de forma recombinante e proteínas expressas em células hospedeiras são considerados isolados para fins da divulgação, tal como são polipéptidos nativos ou recombinantes que foram separados, fraccionados, ou parcialmente ou substancialmente purificados por qualquer técnica adequada.

Também incluídos como polipéptidos da presente divulgação estão fragmentos, derivados, análogos, ou variantes dos polipéptidos anteriores, e quaisquer combinações destes. Os termos "fragmento", "variante", "derivado" e "análogo" quando se referem a anticorpos Sp35 ou anticorpos polipéptidos incluem quaisquer polipéptidos que retêm pelo menos algumas das propriedades de ligação ao antígeno do polipéptido ou anticorpo nativo correspondente. Fragmentos de polipéptidos incluem fragmentos proteolíticos, assim como fragmentos de deleção, além dos fragmentos específicos de anticorpos aqui discutidos noutro lado. Variantes de anticorpos Sp35 e polipéptidos anticorpos incluem fragmentos tal como descrito acima, e também polipéptidos com sequências de aminoácidos alteradas devido a substituições, deleções, ou inserções de aminoácidos. Variantes podem ocorrer naturalmente ou ocorrer de forma não natural. Variantes que ocorrem de forma não

natural podem ser produzidas usando técnicas de mutagénesis conhecidas na técnica. Polipéptidos variantes podem compreender substituições, deleções ou adições de aminoácidos conservativas ou não conservativas. Derivados de anticorpos Sp35 e polipéptidos anticorpos, são polipéptidos que foram alterados de modo a apresentar características adicionais que não se encontram no polipéptido nativo. Exemplos incluem proteínas de fusão. Polipéptidos variantes podem também ser aqui referidos como “polipéptido análogos”. Tal como aqui utilizado um “derivado” de um anticorpo Sp35 ou polipéptido anticorpo refere-se a um polipéptido objecto com um ou mais resíduos quimicamente derivatizados por reacção de um grupo lateral funcional. Também incluídos como “derivados” estão aqueles péptidos que contêm um ou mais aminoácidos que ocorrem naturalmente derivados dos vinte aminoácidos convencionais. Por exemplo, a 4-hidroxiprolina pode ser substituída por prolina; 5-hidroxilisina pode ser substituída por lisina; 3-metil-histidina pode ser substituída por histidina; homoserina pode ser substituída por serina; e ornitina pode ser substituída por lisina.

O termo “polinucleótido” pretende abranger um único ácido nucleico assim como vários ácidos nucleicos, e refere-se a uma molécula ou construção de ácido nucleico isolada, por exemplo, ARN mensageiro (mARN) ou ADN plasmídico (pADN). Um polinucleótido pode compreender uma ligação fosfodiéster convencional ou uma ligação não convencional (por exemplo, uma ligação amida, tal com aquela encontrada em ácido nucleicos peptídicos (ANP)). O termo “ácido nucleico” refere-se a qualquer um ou mais segmentos de ácido nucleico, por exemplo, fragmentos de ADN ou de ARN, presentes num polinucleótido. Por ácido nucleico ou polinucleótido “isolado” pretende-se referir uma molécula de ácido nucleico, ADN ou ARN, que foi removida do seu ambiente nativo. Por

exemplo, um polinucleótido recombinante que codifica para um anticorpo Sp35 contido num vector é considerado isolado para os objectivos da presente divulgação. Outros exemplos de um polinucleótido isolado incluem polinucleótidos recombinantes mantidos em células hospedeiras heterólogas ou polinucleótidos purificados (parcialmente ou substancialmente) em solução. Moléculas de ARN isoladas incluem transcritos de ARN *in vivo* ou *in vitro* de polinucleótidos. Polinucleótidos ou ácido nucleicos isolados incluem ainda tais moléculas produzidas por via sintética. Além disso, polinucleótido ou um ácido nucleico podem ser ou podem incluir um elemento de regulação tal como um promotor, local de ligação a um ribossoma, ou um terminador da transcrição.

Tal como aqui utilizado, um “região codificante” é uma porção de ácido nucleico que consiste em codões traduzidos para aminoácidos. Apesar de um “codão de terminação” (TAG, TGA, ou TAA) não ser traduzido num aminoácido, pode ser considerado como sendo parte de uma região codificante, mas quaisquer sequências que o flanqueiam, por exemplo promotores, locais de ligação a ribossomas, terminadores da transcrição, intrões, e semelhantes, não fazem parte de uma região codificante. Duas ou mais regiões codificantes da divulgação podem estar presentes numa única construção de polinucleótido, por exemplo, num único vector, ou em construções separadas de polinucleótidos, por exemplo, em vectores separados (diferentes). Além disso, qualquer vector pode conter uma única região codificante, ou pode compreender duas ou mais regiões codificantes, por exemplo, um único vector pode codificar separadamente para uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina e uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina. Além disso, um vector, polinucleótido, ou ácido nucleico da divulgação pode

codificar para regiões codificantes heterólogas, sejam fundidas ou não a um ácido nucleico que codifica para um anticorpo Sp35 ou seu fragmento, variante ou derivado. Regiões codificantes heterólogas incluem sem limitação elementos ou unidades especializadas, tais como um péptido sinal de secreção ou um domínio funcional heterólogo.

Nalguns casos, o polinucleótido ou ácido nucleico é ADN. No caso de ADN, um polinucleótido compreendendo um ácido nucleico que codifica para um polipéptido normalmente podem incluir um promotor e/ou outros elementos de controlo da transcrição ou da tradução operativamente associados com uma ou mais regiões codificantes. Uma associação operativa é quando uma região codificante para um produto génico, por exemplo, um polipéptido, está associada com uma ou mais sequências de regulação de tal modo que a expressão do produto génico fique sob influência ou controlo da ou das sequências de regulação. Dois fragmentos de ADN (tais como um polipéptido região codificante e um promotor a ele associado) são "associados operativamente" se a indução da função do promotor resulta na transcrição de mRNA que codifica para o produto génico desejado e se a natureza da ligação entre os dois fragmentos de ADN não interfere com a capacidade das sequências de regulação da expressão em dirigir a expressão do produto génico ou interferir com a capacidade do molde de ADN em ser transcrito. Assim, uma região promotora seria operativamente associada com um ácido nucleico que codifique para um polipéptido se o promotor foi capaz de efectuar a transcrição daquele ácido nucleico. O promotor pode ser um promotor específico para uma célula que dirige transcrição substancial do ADN apenas em células predeterminadas. Outros elementos de controlo da transcrição, para além de um promotor, por exemplo potenciadores, operadores, repressores, e sinais de terminação da transcrição, podem ser

operativamente associados ao polinucleótido para dirigir transcrição específica para uma célula. Promotores adequados e outras regiões de controlo da transcrição são aqui divulgados.

São conhecidas várias regiões de controlo da transcrição pelos peritos na técnica. Estas incluem, sem limitação, regiões de controlo da transcrição que funcionam em células de vertebrados, tais como, mas sem limitação a segmentos promotores e potenciadores de citomegalovírus (o promotor precoce imediato, em conjugação com o intrão-A), vírus símio 40 (o promotor precoce), e retrovírus (tais como o vírus do sarcoma de Rous). Outras regiões de controlo da transcrição incluem aquelas derivadas de genes de vertebrados tais como actina, proteína de choque térmico, hormona de crescimento bovina e β -globina de coelho, assim como outras sequências capazes de controlar a expressão génica em células eucarióticas. Regiões de controlo adequadas adicionais da transcrição incluem promotores e potenciadores específicos para tecidos e assim como promotores indutíveis por linfocinas (por exemplo, promotores indutíveis por interferões ou interleucinas).

Da mesma forma, uma variedade de elementos de controlo de tradução são conhecidos pelos peritos na técnica. Estes incluem, mas não estão limitados a, locais de ligação ao ribossoma, codões de iniciação e de terminação da tradução, e elementos derivados de picornavírus (particularmente um local interno de entrada de ribossoma, ou IRES, também referida como uma sequência CITE).

Noutros casos, um polinucleótido da presente divulgação é ARN, por exemplo, sob a forma de ARN mensageiro (mARN).

As regiões que codificam o polinucleótido e o ácido nucleico da presente divulgação podem ser associados com regiões codificantes adicionais que codificam para os péptidos de sinal ou secreção, que dirigem a secreção de um polipéptido codificado por um polinucleótido da presente divulgação. De acordo com a hipótese de sinal, proteínas secretadas por células de mamífero têm um péptido de sinal ou sequência líder de secreção que é clivada da proteína madura, uma vez iniciada a exportação da cadeia de proteína em crescimento através do retículo endoplasmático rugoso. Aqueles competentes na técnica estão cientes de que polipéptidos secretados por células de vertebrados têm, geralmente, um péptido de sinal fundido com a extremidade N do polipéptido, que é clivado do polipéptido completo ou de "comprimento total" para produzir uma forma secretada ou "madura" do polipéptido. Em certos casos, utiliza-se o péptido de sinal nativo, por exemplo, um péptido sinal de uma cadeia ou de uma cadeia leve de imunoglobulina, ou um derivado funcional dessa sequência que retenha a capacidade para dirigir a secreção do polipéptido que está operativamente associado com ela. Alternativamente, um péptido de sinal heterólogo de mamífero, ou um seu derivado funcional, podem ser utilizados. Por exemplo, a sequência líder nativa pode ser substituída pela sequência líder do activador de plasminogénio tecidual humano (TPA) ou a β -glucuronidase de rato.

A presente divulgação é dirigida a certos anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados. A menos que feita referência específica aos anticorpos de tamanho completo, tais como os anticorpos que ocorrem naturalmente, o termo "anticorpos Sp35" inclui anticorpos SP35-tamanho completo, bem como fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, análogos ou derivados de tais anticorpos, por exemplo, um anticorpo que ocorre

naturalmente ou moléculas de imunoglobulina ou moléculas ou fragmentos modificados de anticorpos que se ligam ao antigénio de um modo semelhante às moléculas de anticorpos. Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são aqui utilizados indiferentemente. Um anticorpo ou imunoglobulina compreende pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada, e normalmente compreende pelo menos os domínios variáveis de uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Estruturas básicas de imunoglobulina em sistemas vertebrados são relativamente bem compreendidas. Ver, por exemplo, de Harlow et al, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988). Como será discutido em mais detalhe abaixo, o termo "imunoglobulina" compreende várias classes amplas de polipéptidos que podem ser distinguidos bioquimicamente. Os peritos na técnica apreciarão que as cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ), com algumas subclasses entre eles (por exemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). É a natureza desta cadeia, que determina a "classe" do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgG, ou IgE, respectivamente.

As subclasses de imunoglobulina (isotipos), por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, etc, são bem caracterizadas e são conhecidos por conferir especialização funcional. Versões modificadas de cada uma destas classes e isotipos são facilmente perceptíveis para um especialista na matéria tendo em vista a presente divulgação e, portanto, estão no âmbito da divulgação. Todas as classes de imunoglobulinas estão claramente dentro do âmbito da divulgação, a discussão seguinte irá geralmente ser dirigida para a classe IgG de moléculas de imunoglobulina. No que respeita à IgG, uma molécula de imunoglobulina padrão é composta por dois polipéptidos de cadeia leve idênticos de peso molecular de aproximadamente 23000 Daltons, e dois polipéptidos de cadeia pesada idênticos de peso molecular de 53000-70000. As quatro

cadeias são tipicamente unidas por pontes dissulfureto numa configuração "Y" em que as cadeias leves rodeiam as cadeias pesadas começando na boca do "Y" e continuando através da região variável.

As cadeias leves são classificadas como kapa ou lambda (κ , λ). Cada classe de cadeia pesada pode ser ligada tanto com a cadeia leve kapa como com a lambda. Em geral, as cadeias leve e pesada estão covalentemente ligadas uma à outra, e as porções da "cauda" das duas cadeias pesadas estão ligadas uma à outra por ligações dissulfureto covalentes ou ligações não covalentes quando as imunoglobulinas são geradas ou por hibridomas, ou células B ou células hospedeiras geneticamente modificadas. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácidos desenvolvem-se a partir de uma extremidade N nas pontas bifurcadas da configuração Y para a extremidade C no final de cada cadeia.

Ambas as cadeias, quer a leve e a pesada, estão divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. Os termos "constante" e "variável" são usados funcionalmente. A este respeito, deve notar-se que os domínios variáveis de ambas as porções da cadeia leve (V_L) e pesada (V_H) determinam o reconhecimento e a especificidade do antigénio. Por outro lado, os domínios constantes da cadeia leve (C_L) e da cadeia pesada (C_{H1} , C_{H2} ou C_{H3}) conferem propriedades biológicas importantes tais como secreção, mobilidade transplacentária, a ligação do receptor Fc, a ligação do complemento e similares. Por convenção, a numeração dos domínios da região constante aumenta à medida que eles se tornam mais distais relativamente ao local de ligação do antigénio ou da extremidade amina do anticorpo. A porção N-terminal é uma região variável e a porção da extremidade C é uma região constante; os domínios C_{H3} e C_L compreendem, na verdade, a

extremidade carboxilo da cadeia pesada e leve, respectivamente.

Tal como indicado acima, a região variável permite ao anticorpo reconhecer selectivamente e se ligar especificamente a epitopos em antigénios. Isto é, o domínio V_L e domínio V_H , ou um subconjunto das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de um anticorpo combinam-se para formar a região variável que define um local de ligação ao antígeno tridimensional. Esta estrutura do anticorpo quaternário constitui o local de ligação ao antígeno presente na extremidade de cada braço do Y. Mais especificamente, o local de ligação ao antígeno é definida por três CDR de cada uma das cadeias V_H e V_L . Nalguns casos, por exemplo, certas moléculas de imunoglobulina derivadas de espécies de camelídeos ou modificadas com base em imunoglobulinas de camelídeos, uma molécula de imunoglobulina completa podem consistir apenas em cadeias pesadas, sem cadeias leves. Ver, por exemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446-448 (1993).

Em anticorpos que ocorrem naturalmente, as seis “regiões determinantes de complementaridade” ou “CDR” presentes em cada domínio de ligação ao antígeno são sequências curtas, não contíguas de aminoácidos que são especificamente posicionadas de modo a formar o domínio de ligação ao antígeno à medida que o anticorpo assume a sua configuração tridimensional num ambiente aquoso. Os restantes aminoácidos nos domínios de ligação ao antígeno, referidos como regiões “estruturais”, apresentam menos variabilidade intermolecular. As regiões estruturais adoptam sobretudo uma conformação em folha β e as CDRs formam laços que ligam, e nalguns casos fazem parte da estrutura de folhas β . Assim, regiões estruturais actuam de modo a formar uma estrutura de suporte

que proporciona o posicionamento das CDRs na orientação correcta por interacções inter-cadeia, interacções não-covalentes. O domínio de ligação ao antigénio formado pelas CDRs posicionadas define uma superfície complementar ao epitopo no antigénio imunorreactivo. Esta superfície complementar promove a ligação não-covalente do anticorpo ao seu epitopo cognato. Os aminoácidos que compõem as CDR e as regiões estruturais, respectivamente, podem ser facilmente identificadas por qualquer região variável da cadeia pesada por qualquer pessoa competente na técnica, uma vez que elas foram já definidas com precisão (ver, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); e Chothia e Lesk, *J. Mol Biol.*, 196: 901-917 (1987)).

No caso de existirem duas ou mais definições de um termo que é usado e/ou aceite na técnica, a definição do termo como aqui usada destina-se a incluir todos esses significados, excepto se explicitamente indicado para o contrário. Um exemplo específico é a utilização do termo "região determinante de complementaridade" ("CDR") para descrever os locais de combinação de antigénio não-contíguos encontrados no interior da região variável de ambos os polipéptidos de cadeia pesada e leve. Esta região tem sido descrita por Kabat et al, U.S. Dept. Of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) e por Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), em que as definições incluem sobreposição ou subconjuntos de resíduos de aminoácidos, quando comparadas umas com as outras. No entanto, a aplicação de qualquer uma das definições para se referir a uma CDR de um anticorpo ou as suas variantes pretende-se que esteja no âmbito do termo tal como aqui usado e definido. Os resíduos de aminoácidos adequados que compreendem as CDR tal como definidas por cada uma das

referências citadas acima são apresentados abaixo na Tabela I como uma comparação. O número exacto de resíduos que abrangem uma CDR particular irá variar dependendo do tamanho da sequência e da CDR. Os peritos na técnica podem determinar de forma rotineira quais os resíduos que compreendem uma CDR particular, dada a sequência de aminoácidos da região variável do anticorpo.

TABELA 1. Definições de CDR¹

	Kabat	Chothia
V _H CDR1	31-35	26-32
V _H CDR2	50-65	52-58
V _H CDR3	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32
V _L CDR2	50-56	50-52
V _L CDR3	89-97	91-96

¹A numeração de todas as definições de CDR da Tabela 1 é de acordo com as convenções de numeração definidas por Kabat et al. (ver abaixo).

Kabat et al. também definiu um sistema de numeração para as sequências de domínio variável que é aplicável a qualquer anticorpo. Um perito na técnica consegue atribuir sem ambiguidades este sistema de “numeração de Kabat” a qualquer sequência de domínio variável, sem se basear em quaisquer dados experimentais para além da própria sequência. Tal como aqui utilizado, “numeração de Kabat” refere-se ao sistema de numeração estabelecido por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983). Salvo indicação em contrário, as referências à numeração das posições específicas de resíduos de aminoácidos num anticorpo Sp35 ou num seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado estão de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

Nas espécies de camelídeos, a cadeia pesada da região variável, designada por V_{HH} , constitui a totalidade do domínio de ligação ao antigénio. As principais diferenças entre as regiões variáveis V_{HH} de camelídeos e aqueles derivados a partir de anticorpos convencionais (V_H) incluem: (a) mais aminoácidos hidrofóbicos na superfície de contacto da cadeia leve da V_H , em comparação com a região correspondente em V_{HH} , (b) uma CDR3 mais comprida em V_{HH} e (c) a ocorrência frequente de uma ligação dissulfureto entre CDR1 e CDR3 em V_{HH} .

Os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, anticorpos policlonais, monoclonais, multiespecífico, humanos, humanizados, primatizados, ou quiméricos, anticorpos de cadeia simples, fragmentos de ligação a epitopo, por exemplo, Fab, Fab' e $F(ab')_2$, Fd, Fvs, Fvs de cadeia simples (scFv), anticorpos de cadeia simples, Fvs ligados por dissulfureto (sdFv), fragmentos compreendendo ou um V_L ou V_H domínios, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, e anticorpos (anti-Id) anti-idiotípicos (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id para anticorpos Sp35 aqui divulgados). Moléculas ScFv são conhecidas na técnica e são descritos, por exemplo, na patente US 5,892,019. A imunoglobulina ou moléculas de anticorpo da divulgação podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina.

Os fragmentos de anticorpos, incluindo os anticorpos de cadeia simples, podem compreender a ou as regiões variáveis isoladamente ou em combinação com a totalidade ou uma porção das seguintes: região de charneira, domínios C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} .

Também incluídos na divulgação estão fragmentos de ligação ao antigénio, também compreendendo qualquer combinação de região ou regiões variáveis com uma região de charneira, domínios C_H1, C_H2 e C_H3. Anticorpos ou seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos de diagnóstico e terapêuticos aqui descritos podem ser de qualquer origem animal, incluindo aves e mamíferos. De preferência, os anticorpos são anticorpos de humanos, murinos, burros, coelhos, cabras, cobaias, camelos, lamas, cavalos, ou de galinha. Noutro caso, a região variável pode ser de origem em peixes cartilagíneos (por exemplo, a partir de tubarões). Tal como aqui utilizado, anticorpos "humanos" incluem anticorpos que possuem a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e incluem anticorpos isolados a partir de bibliotecas de imunoglobulinas humanas ou de animais transgênicos para uma ou mais imunoglobulinas humanas e que não expressam imunoglobulinas endógenas, tal como descrito abaixo e, por exemplo, em, U.S. Pat. No. 5,939,598 por Kucherlapati et al.

Tal como aqui utilizado, o termo "porção de cadeia pesada", inclui as sequências de aminoácidos derivadas de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Um polipéptido que compreende uma porção de cadeia pesada compreende, pelo menos, um dos seguintes: um domínio C_H1, um domínio "hinge" (por exemplo, uma região "hinge" superior, média, e/ou inferior), um domínio C_H2, um domínio C_H3, ou uma sua variante ou um seu fragmento. Por exemplo, um polipéptido de ligação pode compreender uma cadeia de polipéptido compreendendo um domínio C_H1, uma cadeia de polipéptido compreendendo um domínio C_H1, pelo menos uma porção de um domínio "hinge" e um domínio C_H2; uma cadeia de polipéptido compreendendo um domínio C_H1 e um domínio C_H3; uma cadeia de polipéptido que compreende um domínio C_H1, pelo menos uma porção de um domínio "hinge" e um domínio C_H3; ou uma cadeia polipeptídica

que compreende um domínio C_{H1} , pelo menos uma porção de um domínio "hinge", um domínio C_{H2} , e um domínio C_{H3} . Noutro exemplo, um polipéptido da divulgação compreende uma cadeia polipeptídica que compreende um domínio C_{H3} . Além disso, um polipéptido de ligação para uso na divulgação, pode não ter pelo menos uma porção de um domínio C_{H2} (por exemplo, a totalidade ou parte de um domínio C_{H2}). Como acima foi referido, será entendido por um perito na técnica que estes domínios (por exemplo, as porções de cadeia pesada) podem ser modificadas de tal forma que elas variam na sequência de aminoácidos da molécula de imunoglobulina que existe naturalmente.

Em certos anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados aqui descritos, as porções de cadeia pesada de uma cadeia de polipéptido de um multímero são idênticas àquelas de uma segunda cadeia de polipéptido do multímero. Alternativamente, os monómeros contendo a porção da cadeia pesada da divulgação não são idênticos. Por exemplo, cada monómero pode compreender um local alvo de ligação diferente, formando, por exemplo, um anticorpo bi-específico.

As porções de cadeia pesada de um polipéptido de ligação para utilização nos métodos de diagnóstico e de tratamento aqui divulgados podem ser derivados de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, uma porção de um polipéptido de cadeia pesada pode compreender um domínio C_{H1} derivado de uma molécula de IgG1 e uma região "hinge" de uma molécula derivada de IgG3. Num outro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode incluir uma região "hinge" derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG3. Num outro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode incluir

uma região "hinge" quimérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG4.

Tal como aqui utilizado, o termo "porção de cadeia leve" inclui as sequências de aminoácidos derivadas de uma cadeia leve de imunoglobulina. De preferência, a porção da cadeia leve compreende pelo menos um de um domínio V_L ou C_L.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados aqui divulgados podem ser descritos ou especificados em termos do ou dos epitopos ou porções) de um antigénio, por exemplo, um polipéptido alvo (Sp35) que reconhecem ou se ligam especificamente. A porção de um polipéptido alvo, que interage especificamente com o domínio de ligação ao antigénio de um anticorpo é um "epitopo" ou "determinante antigénico". Um polipéptido alvo pode compreender um único epitopo, mas compreende tipicamente pelo menos dois epitopos, e pode incluir qualquer número de epitopos, dependendo do tamanho, da conformação, e do tipo de antigénio. Além disso, deve notar-se que um "epitopo" num polipéptido alvo pode ser ou incluir elementos não polipeptídicos, por exemplo, um "epitopo" pode incluir uma cadeia lateral de hidrato de carbono.

Crê-se que a dimensão mínima de um epitopo de péptido ou polipéptido para um anticorpo seja de cerca de quatro a cinco aminoácidos. Epitopos de péptido ou polipéptido, de preferência contêm pelo menos sete, mais preferencialmente pelo menos nove e preferivelmente pelo menos entre cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos. Uma vez que uma CDR pode reconhecer um polipéptido ou péptido antigénico na sua forma terciária, os aminoácidos que compreende um epitopo não precisam de ser contíguos, e, nalguns casos, pode, até não estar na mesma cadeia de péptido. Na presente divulgação, o

epitopo de polipéptido ou péptido reconhecido pelos anticorpos Sp35 da presente divulgação contém uma sequência de pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, mais preferivelmente pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, ou entre cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos contíguos ou não contíguos de Sp35.

Por "liga-se especificamente" entende-se geralmente que um anticorpo se liga a um epitopo através do seu domínio de ligação ao antigénio, e que a ligação envolve alguma complementaridade entre o domínio de ligação ao antigénio e o epitopo. De acordo com esta definição, um anticorpo diz-se "ligar especificamente" a um epitopo que se liga àquele epitopo, através do seu domínio de ligação ao antigénio, mais rapidamente do que se ligaria a um epitopo aleatório, não relacionado. O termo "especificidade" é aqui usado para qualificar a afinidade relativa com a qual um determinado anticorpo se liga a um determinado epitopo. Por exemplo, o anticorpo "A" pode ser considerado como tendo uma elevada especificidade para um determinado epitopo do que o anticorpo "B", ou o anticorpo de "A" pode ser referido ligar-se ao epitopo "C" com uma especificidade mais elevada do que aquela que tem para o epitopo relacionado "D".

Por "liga-se preferencialmente" entende-se que o anticorpo se liga especificamente a um epitopo mais rapidamente do que se ligaria a um epitopo relacionado, semelhante, homólogo, ou análogo. Assim, um anticorpo que se "liga preferencialmente" a um determinado epitopo irá provavelmente ligar-se àquele epitopo do que a um epitopo relacionado, apesar de um tal anticorpo poder ter uma reacção cruzada com o epitopo relacionado.

A título de exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado ligar-se a um primeiro epitopo preferencialmente se se ligar ao referido primeiro epitopo com uma constante de dissociação (K_D) que é menor do que a K_D do anticorpo para o segundo epitopo. Noutro exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado ligar-se a um primeiro antigénio preferencialmente se se ligar o primeiro epitopo com uma afinidade que é pelo menos uma ordem de grandeza menor do que a K_D do anticorpo para o segundo epitopo. Noutro exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado ligar-se a um primeiro epitopo preferencialmente se se ligar ao primeiro epitopo com uma afinidade que é pelo menos duas ordens de grandeza menor do que a K_D do anticorpo para o segundo epitopo.

Noutro exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado ligar-se a um primeiro epitopo preferencialmente se se ligar ao primeiro epitopo com uma velocidade de dissociação ($k(\text{dissociação})$), que é menor do que a $k(\text{dissociação})$ do anticorpo para o segundo epitopo. Noutro exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado ligar-se a um primeiro epitopo preferencialmente se se ligar ao primeiro epitopo com uma afinidade que é pelo menos uma ordem de grandeza menor do que a $k(\text{dissociação})$ do anticorpo para o segundo epitopo. Noutro exemplo não limitativo, um anticorpo pode ser considerado ligar-se a um primeiro epitopo preferencialmente se se ligar ao primeiro epitopo com uma afinidade que é pelo menos duas ordens de grandeza menor do que a $k(\text{dissociação})$ do anticorpo para o segundo epitopo.

Um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante ou derivado aqui divulgado pode ser referido como se ligando a um polipéptido alvo aqui divulgado ou um seu fragmento ou uma sua variante com uma velocidade de

dissociação ($k(\text{dissociação})$) inferior ou igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-3} s^{-1} . Mais preferencialmente, um anticorpo da divulgação pode ser referido como se ligando a um polipéptido alvo aqui descrito ou um seu fragmento ou uma sua variante com uma velocidade de dissociação ($k(\text{dissociação})$) inferior ou igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ou 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-7} s^{-1} .

Um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antigénio, variante ou derivado, aqui divulgado pode ser referido como se ligando a um polipéptido alvo aqui divulgado ou um seu fragmento ou uma sua variante, com uma velocidade de associação ($k(\text{associação})$) superior ou igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Mais preferencialmente, um anticorpo da divulgação pode ser referido como se ligando a um polipéptido alvo aqui descrito ou um seu fragmento ou uma sua variante, com uma velocidade de associação ($k(\text{associação})$) superior ou igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Um anticorpo é referido inibir competitivamente a ligação de um anticorpo de referência a um dado epitopo se se ligar preferencialmente ao epitopo na medida em que bloqueia, até certo grau, a ligação do anticorpo de referência ao epitopo. A inibição competitiva pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, os ensaios de ELISA competitivos. Um anticorpo pode ser referido inibir competitivamente a ligação do anticorpo de referência a um dado epitopo de pelo menos, 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou, pelo menos, 50%.

Tal como aqui utilizado, o termo "afinidade" refere-se a uma medida da força da ligação de um epitopo individual com a CDR

de uma molécula de imunoglobulina. Ver, por exemplo, Harlow *et al*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a 1988) nas páginas 27-28. Tal como aqui utilizado, o termo "avidez" refere-se à estabilidade global do complexo entre uma população de imunoglobulinas e um antigénio, ou seja, a força da combinação funcional de uma mistura de imunoglobulina com o antigénio. Ver, por exemplo, Harlow, nas páginas 29-34. A avidez está relacionada tanto com a afinidade de moléculas de imunoglobulina individuais na população com epitopos específicos, e também com as valências das imunoglobulinas e do antigénio. Por exemplo, a interacção entre um anticorpo monoclonal bivalente e um antigénio com uma estrutura de epitopo altamente repetida, tal como um polímero, seria uma de grande avidez.

Anticorpos Sp35 anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados também podem ser descritos ou especificados em termos da sua reactividade cruzada. Tal como aqui utilizado, o termo "a reactividade cruzada" refere-se à capacidade de um anticorpo, específico para um antigénio, reagir com um segundo antigénio; uma medida de parentesco entre duas substâncias antigénicas diferentes. Assim, um anticorpo tem reacção cruzada se se ligar a um epitopo diferente daquele que induziu a sua formação. O epitopo com reacção cruzada geralmente contém muitas das mesmas características estruturais complementares que o epitopo indutor e, nalguns casos, pode efectivamente se ajustar melhor do que o original.

Por exemplo, certos anticorpos têm algum grau de reactividade cruzada, em que eles se ligam a epitopos relacionados, mas não-idênticos, por exemplo, os epitopos com pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 65%, pelo menos 60%, pelo

menos 55%, e pelo menos 50% de identidade (como calculada utilizando métodos conhecidos na técnica e aqui descritos) para um epitopo de referência. Um anticorpo pode ser considerado como tendo pouca ou nenhuma reactividade cruzada, se não se liga a epitopos com menos de 95%, menos de 90%, menos de 85%, menos de 80%, menos de 75%, menos de 70%, menos de 65%, menos de 60%, menos de 55%, e menos de 50% de identidade (como calculada utilizando métodos conhecidos na técnica e aqui descritos) a um epitopo de referência. Um anticorpo pode ser considerado como "altamente específico" para um determinado epitopo, se ele não se ligar a qualquer outro análogo, ortólogo ou homólogo daquele epitopo.

Anticorpos Sp35 ou fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados também podem ser descritos ou especificados em termos da sua afinidade de ligação a um polipéptido. As afinidades de ligação preferidas incluem aquelas com uma constante de dissociação ou K_d inferiores a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

Anticorpos Sp35 anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados podem ser "multiespecíficos", por exemplo, bi-específicos, tri-específicos ou de maior multi-especificidade, o que significa que ele reconhece e se liga a dois ou mais epitopos diferentes apresentar num ou mais antigénios diferentes (por exemplo, proteínas), ao mesmo tempo. Assim, se um anticorpo Sp35 é "mono-específico" ou "multi-específico", por exemplo, "bi-específico", refere-se ao número de diferentes epitopos com os quais um polipéptido de ligação reage. Os anticorpos

multi-específicos podem ser específicos para epitopos diferentes de um polipeptídeo alvo aqui descrito ou pode ser específico para um polipéptido alvo, bem como para um epitopo heterólogo, tal como um polipeptídeo heterólogo ou um material de suporte sólido.

Tal como aqui utilizado, o termo "valência" refere-se ao número de possíveis domínios de ligação, por exemplo, os domínios de ligação ao antigénio, presentes num anticorpo Sp35, polipéptido de ligação ou anticorpo. Cada domínio de ligação se liga especificamente a um epitopo. Quando um anticorpo Sp35, polipéptido de ligação ou anticorpo compreende mais do que um domínio de ligação, cada domínio de ligação pode ligar-se especificamente ao mesmo epitopo, para um anticorpo com dois domínios de ligação, denominado "bivalente mono-específico", ou a epitopos diferentes, para um anticorpo com dois domínios de ligação, denominado "bivalente bi-específico". Um anticorpo pode também ser bi-específico e bivalente para cada especificidade (denominados "anticorpos tetravalentes bi-específicos"). Noutro exemplo, podem ser preparados "minibodies" tetravalentes ou anticorpos com eliminação de domínio.

Anticorpos bi-específicos bivalentes, e os métodos para a sua preparação, são descritos, por exemplo, nas Patentes dos E.U.A. Nos. 5,731,168, 5,807,706, 5,821,333, Publicações de Pedidos de Patente dos E.U.A. Nos. 2003/020734 e 2002/0155537, cujas divulgações de todas são aqui incorporadas por referência. Anticorpos tetravalentes, biespecíficos, e métodos para a sua preparação, são descritos, por exemplo, em WO 02/096948 e WO 00/44788. Ver em geral, as publicações PCT WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360, WO 92/05793; Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60-69 (1991), Patentes dos E.U.A. Nos. 4,474,893, 4,714,681,

4,925,648, 5,573,920, 5,601,819; Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992).

Conforme indicado anteriormente, as estruturas de subunidade e a configuração tridimensional das regiões constantes das várias classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Tal como aqui utilizado, o termo "domínio V_H " inclui o domínio variável de extremidade amina de uma cadeia pesada de imunoglobulina e o termo "domínio C_{H1} " inclui o primeiro domínio de região constante (mais próxima da extremidade amina) de uma cadeia pesada de imunoglobulina. O domínio C_{H1} é adjacente ao domínio V_H e situa-se na extremidade amina em relação à região "hinge" de uma molécula de cadeia pesada de imunoglobulina.

Tal como aqui utilizado, o termo "domínio C_{H2} " inclui a porção de uma molécula de cadeia pesada, que se estende, por exemplo, desde cerca do resíduo 244 até ao resíduo 360 de um anticorpo utilizando esquemas de numeração convencionais (resíduos 244 a 360, sistema de numeração de Kabat, e resíduos 231 a 340, sistema de numeração da UE; ver Kabat EA et al op cit. O domínio C_{H2} é único na medida em que não está intimamente emparelhado com outro domínio. Em vez disso, duas cadeias de hidrato de carbono ramificadas N-ligadas estão interpostas entre os dois domínios C_{H2} de uma molécula de IgG nativa intacta. Também está bem documentado que o domínio C_{H3} estende-se desde o domínio C_{H2} para a extremidade C da molécula de IgG e compreende aproximadamente 108 resíduos.

Tal como aqui utilizado, o termo "região "hinge"" inclui a porção de uma molécula de cadeia pesada une o domínio C_{H1} ao domínio C_{H2} . Esta região "hinge" compreende cerca de 25 resíduos e é flexível, permitindo assim que as duas regiões de ligação ao antigénio da extremidade N se movam de forma independente. As regiões "hinge" podem ser subdivididas em

três domínios distintos: domínios “hinge” superior, médio e inferior (Roux *et al.*, *J. Immunol.* 161: 4083 (1998)).

Tal como aqui utilizado, o termo “ligação dissulfureto” inclui a ligação covalente formada entre dois átomos de enxofre. O aminoácido cisteína compreende um grupo tiol que pode formar uma ponte dissulfureto ou uma ponte com um segundo grupo de tiol. Na maioria das moléculas de classe IgG que ocorrem naturalmente, as regiões C_L e C_{H1} estão ligadas por uma ligação de dissulfureto e as duas cadeias pesadas estão ligadas por ligações de dissulfureto nas posições correspondentes a 239 e 242, utilizando o sistema de numeração de Kabat (posição 226 ou 229, o sistema de numeração da UE).

Tal como aqui utilizado, o termo “anticorpo quimérico” significará qualquer anticorpo em que a região ou local imunorreactivo se obtém ou deriva de uma primeira espécie e a região constante (que pode estar intacta, parcial ou modificada de acordo com a divulgação) é obtida de uma segunda espécie. Em exemplos preferidos a região ou local de ligação ao alvo será de uma fonte não humana (por exemplo, rato ou primata) e a região constante é humana.

Tal como aqui utilizado, o termo “anticorpo modificado” refere-se a um anticorpo em que o domínio variável quer na cadeia pesada e leve, ou ambas, é alterado por pelo menos uma substituição parcial de uma ou mais CDRs de um anticorpo de especificidade conhecida e, se necessário, por substituição parcial região estrutural e alteração de sequência. Embora as CDR possam ser derivadas de um anticorpo da mesma classe ou mesmo subclasse que o anticorpo a partir do qual as regiões estruturais são derivadas, pretende-se que as CDRs sejam derivadas de um anticorpo da classe diferente e de

preferência de um anticorpo de uma espécie diferente. Um anticorpo modificado em que uma ou mais CDRs “doadores” de um anticorpo não-humano de especificidade conhecida estão inseridas numa região estrutural de cadeia pesada ou leve humana é aqui referido como um “anticorpo humanizado”. Pode não ser necessário substituir todas as CDRs com as CDRs completas da região variável do doador para transferir a capacidade de ligação ao antigénio de um domínio variável para outro. Em vez disso, pode ser apenas necessário transferir aqueles resíduos que são necessários para manter a actividade do local de ligação ao alvo. Dadas as explicações apresentadas em, por exemplo, Patentes dos E.U.A. Nos. 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, e 6,180,370, estará bem no âmbito da competência dos peritos na técnica, ou através da realização de experiências de rotina, ou por ensaios de tentativa e erro para obter um anticorpo humanizado ou modificado funcional.

Tal como aqui utilizado, o termo “polipéptido correctamente enrolado” inclui polipéptidos (por exemplo, anticorpos Sp35), nos quais todos os domínios funcionais que compreendem o polipéptido são distintamente activos. Tal como aqui utilizado, o termo “polipéptido incorrectamente enrolado” inclui polipéptidos nos quais pelo menos um dos domínios funcionais do polipéptido não está activo. Num exemplo, um polipéptido correctamente enrolado, compreende cadeias polipeptídicas ligadas por pelo menos uma ligação dissulfureto, e, inversamente, um polipéptido incorrectamente enrolado compreende cadeias polipeptídicas não ligadas por pelo menos uma ligação de dissulfureto.

Tal como aqui utilizado, o termo “modificado” inclui a manipulação de moléculas de ácido nucleico ou de polipéptido, por meios sintéticos (por exemplo, por técnicas

recombinantes, síntese de péptidos *in vitro*, por ligação enzimática ou química de péptidos ou alguma combinação destas técnicas).

Tal como aqui utilizados, os termos “ligado”, “fundido” e “fusão” são usados indiferentemente. Esses termos referem-se à união de mais dois elementos ou componentes, por qualquer meio, incluindo a conjugação química ou meios recombinantes. Uma “fusão em grelha” refere-se à união de duas ou mais grelhas de leitura abertas de polinucleótidos (ORFs) para formar uma ORF contínua mais comprida, de uma maneira que mantém a grelha de leitura de tradução correcta das ORFs originais. Assim, uma proteína de fusão recombinante é uma única proteína que contém dois ou mais segmentos que correspondem aos polipéptidos codificados pelas ORFs originais (cujos segmentos não são normalmente assim unidos na natureza). Embora a grelha de leitura ser assim tornada contínua ao longo dos segmentos fusionados, os segmentos podem ser fisicamente ou espacialmente separados, por exemplo, uma sequência de ligação na grelha. Por exemplo, polinucleótidos que codificam para as CDR de uma região variável de imunoglobulina podem ser fundidos, em grelha, mas ser separadas por um polinucleótido que codifica pelo menos uma região estrutural de imunoglobulina ou regiões CDR adicionais, desde que os CDRs “fundidos” sejam co-traduzidos como parte de um polipéptido contínuo.

No contexto de polipéptidos, uma “sequência linear” ou uma “sequência” é uma ordem de aminoácidos num polipéptido na direcção de uma extremidade amina para carboxilo em que os resíduos vizinhos na sequência são contíguos na estrutura primária do polipéptido.

O termo “expressão”, tal como aqui utilizado refere-se a um processo pelo qual um gene produz um bioquímico, por exemplo, um ARN ou um polipéptido. O processo inclui qualquer manifestação da presença funcional do gene dentro da célula, incluindo, sem limitação, o “knockdown” do gene, bem como, tanto a expressão transitória como a expressão estável. Inclui, sem limitação, a transcrição do gene em ARN mensageiro (mARN), ARN de transferência (tARN), ARN “shorthairpin” (shARN), pequeno ARN de interferência (siARN) ou qualquer outro produto de ARN e a tradução de tal mARN em polipéptido(s). Se o produto final desejado é um bioquímico, a expressão inclui a criação desse bioquímico e quaisquer precursores. A expressão de um gene que produz um “produto génico”. Tal como aqui utilizado, um produto génico pode ser um ácido nucleico, por exemplo, um ARN mensageiro produzido por transcrição de um gene, ou de um polipéptido que é traduzido a partir de um transcrito. Os produtos génicos aqui descritos incluem ainda ácidos nucleicos com modificações pós-transcrição, por exemplo, de poliadenilação, ou polipéptidos com modificações pós-tradução, por exemplo, glicosilação, metilação, a adição dos lípidos, a associação com outras subunidades de proteína, clivagem proteolítica, e semelhantes.

Tal como aqui utilizados, os termos “tratar” ou “tratamento” referem-se tanto ao tratamento terapêutico e a medidas profiláticas ou preventivas, em que o objectivo é prevenir ou travar (diminuir) uma alteração fisiológica ou distúrbio indesejados, tais como a progressão de esclerose múltipla. Os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, alívio de sintomas, diminuição da extensão da doença, estado de doença estabilizado (isto é, sem piorar), atraso ou retardamento da progressão da doença, melhoria ou palição do estado da doença, e remissão (quer

parcial ou total), seja detectável ou não detectável. “Tratamento” também pode significar prolongar a sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada se não receber o tratamento. Aqueles que necessitam de tratamento incluem aqueles já com a doença ou distúrbio bem como aqueles propensos a ter a doença ou distúrbio ou aqueles em que a doença ou distúrbio se pretende prevenir.

Por “sujeito” ou “indivíduo” ou “animal” ou “paciente” ou “mamífero” entende-se qualquer sujeito, particularmente um sujeito mamífero, para o qual o diagnóstico, prognóstico ou terapia são desejados. Sujeitos mamíferos incluem os seres humanos, animais domésticos, animais de criação, e de jardins zoológicos, para desporto, ou animais de estimação, tais como cães, gatos, porquinhos da índia, coelhos, ratos, cavalos, gado, vacas, e assim por diante.

Tal como aqui usadas, frases tais como “um sujeito que iria beneficiar da administração de um anticorpo Sp35” e “um animal em necessidade de tratamento” inclui sujeitos, tais como sujeitos mamíferos, que beneficiariam da administração de um anticorpo utilizado Sp35 usado, por exemplo, para a detecção de um polipéptido Sp35 (por exemplo, durante um procedimento de diagnóstico) e/ou do tratamento, ou seja, palição ou prevenção de uma doença tal como esclerose múltipla, com um anticorpo Sp35. Como descrito aqui em mais pormenor, o anticorpo SP35 pode ser utilizado na forma não conjugada ou pode ser conjugado, por exemplo, a um fármaco, profármaco, ou um isótopo.

II. Sp35

Sp35 humano que ocorre naturalmente (Sp35) é uma proteína específica do sistema nervoso central glicosilada que se prevê ter 614 aminoácidos (SEQ ID NO: 2), incluindo uma

sequência de sinal de 33 aminoácidos. Sp 35 também é conhecido na técnica pelos nomes LINGO-1, LRRN6, LRRN6A, FLJ14594, LERN1, MGC17422 e UNQ201. O polipéptido Sp35 humano, de comprimento total nativo contém um domínio LRR composto por 14 repetições ricas em leucina (incluindo tampas nas extremidades N e C), um domínio Ig, uma região transmembranar e um domínio citoplasmático. O domínio citoplasmático contém um local de fosforilação de tirosina canônica. Além disso, a proteína que ocorre naturalmente Sp35 contém uma sequência de sinal, uma região de base curta entre o LRRCT e o domínio Ig, e uma região transmembranar entre o domínio de Ig e o domínio citoplasmático. O gene Sp35 humano (SEQ ID NO: 1) contém os codões de iniciação da tradução alternativos, de modo a que seis aminoácidos adicionais, ou seja, MQVSKR (SEQ ID NO: 3) possam ou não estar presentes na extremidade N da sequência sinal de Sp35. A Tabela 2 lista os domínios Sp35 e outras regiões, de acordo com o número dos resíduos de aminoácidos, com base na sequência de aminoácidos de Sp35 aqui apresentada como SEQ ID NO: 2. O polipéptido Sp35 é caracterizado em maior detalhe na Publicação PCT No. WO 2004/085648.

TABELA 2--Domínios Sp35

Domínio ou Região	Resíduo inicial	Resíduo Final
Sequência de Sinal	1	33 ou 35
LRRNT	34 ou 36	64
LRR	66	89
LRR	90	113
LRR	114	137
LRR	138	161
LRR	162	185
LRR	186	209

LRR	210	233
LRR	234	257
LRR	258	281
LRR	282	305
LRR	306	329
LRR	330	353
LRRCT	363	414 ou 416
Básico	415 ou 417	424
Ig	419	493
Sequência de ligação	494	551
Transmembranar	552	576
Citoplasmático	577	614

A distribuição do tecido e de desenvolvimento da expressão de Sp35 foi estudada em humanos e ratos. A biologia de Sp35 foi estudada num modelo animal (rato) experimental. A expressão de Sp35 de rato é localizada nos neurónios e nos oligodendrócitos, tal como determinado por “Northern blot” e coloração imuno-histoquímica. O nível de expressão de mARN de Sp35 de rato é regulado durante o desenvolvimento, com um pico logo após o nascimento, ou seja, cerca do dia um pós-natal. Num modelo de lesão por corte transversal da espinal medula de rato, Sp35 é sobre-regulada no local da lesão, tal como determinado por RT-PCR. Ver Mi *et al.* *Nature Neurosci.* 7: 221-228 (2004).

No contexto dos aminoácidos compreendendo os vários domínios estruturais e funcionais de um polipéptido Sp35, o termo “cerca de” inclui o valor particularmente citado e valores maiores ou menores por vários (por exemplo, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) aminoácidos. Uma vez que a localização destes domínios, tal como listados na Tabela 1, foi prevista por gráficos de computador, alguém competente na técnica apreciará que os resíduos de aminoácidos que constituem os domínios podem variar ligeiramente (por exemplo, em cerca de

1 a 15 resíduos), dependendo dos critérios utilizados para definir o domínio.

Os inventores descobriram que o Sp35 nativo de comprimento total se liga a NgR1. Ver publicação PCT No. WO 2004/085648. Os inventores também descobriram que Sp35 é expressa em oligodendrócitos e que a proteína Sp35 está envolvida na regulação da mielinização dos axônios mediada pelos oligodendrócitos. Ver Publicação da Patente E.U.A. No. 2006/0009388 A1.

A sequência de nucleótidos para a molécula Sp35 de comprimento total é como segue:

```
ATGCTGGCGGGGGCGTGAGGAGCATGCCCAGCCCCCTCCTGGCCTGCTGGCAGCCCATCC
TCCTGCTGGTGCTGGGCTCAGTGCTGTCAGGCTCGGCCACGGGCTGCCCGCCCCGCTGCGA
GTGCTCCGCCCAGGACCGCGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCCGAG
GGCATCCCCACCGAGACGCGCCTGCTGGACCTAGGCAAGAACCGCATCAAAACGCTCAACC
AGGACGAGTTTCGCCAGCTTCCCGCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGAGAACATCGTGAG
CGCCGTGGAGCCCCGGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTCCGGACGCTGGGTCTCCGCAGC
AACCGCCTGAAGCTCATCCCGCTAGGCGTCTTCACTGGCCTCAGCAACCTGACCAAGCTGG
ACATCAGCGAGAACAAGATTGTTATCCTGCTGGACTACATGTTTCAGGACCTGTACAACCT
CAAGTCACTGGAGGTTGGCGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAGCGGC
CTCAACAGCCTGGAGCAGCTGACGCTGGAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCCCACCGAGG
CGCTGTCCACCTGCACGGCCTCATCGTCCTGAGGCTCCGGCACCTCAACATCAATGCCAT
CCGGGACTACTCCTTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAGGTCTTGGAGATCTCCCACTGGCCC
TACTTGGACACCATGACACCCAACTGCCTCTACGGCCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATCA
CACACTGCAATCTGACCGCTGTGCCCTACCTGGCCGTCCGCCACCTAGTCTATCTCCGCTT
CCTCAACCTCTCCTACAACCCCATCAGCACCATTGAGGGCTCCATGTTGCATGAGCTGCTC
CGGCTGCAGGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCTTCC
GCGGCCTCAACTACCTGCGCGTGCTCAATGTCTCTGGCAACCAGCTGACCACACTGGAGGA
ATCAGTCTTCCACTCGGTGGGCAACCTGGAGACACTCATCCTGGACTCCAACCCGCTGGCC
TGCGACTGTCGGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGCCGCTGGCGGCTCAACTTCAACCGGCAGC
AGCCCACGTGCGCCACGCCCCGAGTTTGTCCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGT
GCTACTGCCCAACTACTTACCTGCCGCCGCGCCCGCATCCGGGACCGCAAGGCCCAGCAG
GTGTTTGTGGACGAGGGCCACACGGTGCAAGTTTGTGTGCCGGGCCGATGGCGACCCGCCGC
CCGCCATCCTCTGGCTCTCACCCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCAATGGGCGGCT
CACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTACGCCCAGGTACAGGACAACGGCAGC
TACCTGTGCATCGCGGCCAACGCGGGCGGCAACGACTCCATGCCCCGCCACCTGCATGTGC
GCAGCTACTCGCCCGACTGGCCCCATCAGCCCAACAAGACCTTCGCTTTCATCTCCAACCA
GCCGGGCGAGGGAGAGGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCTTTCCCCTTCGACATCAAG
ACCCTCATCATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCTTTCTGGGCGTGTCTCTTCTTGCC
TGGTGCTGCTGTTTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAAACATCGAGATCGA
GTATGTGCCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAGCTCCGCCGACGCGCCCCGCAAGTTCAAC
ATGAAGATGATATGA (SEQ ID NO: 1).
```

A sequência de polipéptido para o polipéptido Sp35 de comprimento total é como se segue:

MLAGGVRSMPSPLLACWQPILLLLVLGSVLSGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRFFVAVPE
GIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASFPHLEELNENIVSAVEPGAFNNLFNLRTLGLRS
NRLKLIPLGVFTGLSNLTKLDISENKIVILLDYMFDLYNLKSLEVGDNDLVYISHRAFSG
LNSLEQLTLEKCNLTSIPTREALSHLHGLIVLRLRHLNINAIIRDYSFKRLYRLKVLEISHWP
YLDTMTPNCLYGLNLTSLSTHNCNLTAVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPISTIEGSMLHELL
RLQEIQLVGGQLAVVEPYAFRGLNYLRVLNVSGNQLTLEESVFHSGVGNLETLILDSPNLA
CDCRLLWVFRRRWRLNFNRRQQPTCATPEFVQGKEFKDFPDVLLPNYFTCRRARIRDRKAQQ
VFVDEGHTVQFVCRADGDPFPAILWLSPRKHLVSAKSNGRLTVPDGTLEVRYAQVQDNGT
YLCIAANAGGNDSPAHLLHVRSYSPDWPHQPNKTFAFISNQPGEGEANSTRATVPFPFDIK
TLIIATTMGFISFLGVVLFCLVLLFLWSRGKGNTKHNIEIEYVPRKSDAGISSADAPRKFN
MKMI (SEQ ID NO: 2).

III. Anticorpos Sp35

Num exemplo, a presente divulgação é dirigida a anticorpos Sp35, ou fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou seus derivados. Por exemplo, a presente divulgação inclui pelo menos os domínios de ligação ao antígeno de certos anticorpos monoclonais, e fragmentos, variantes, e os seus derivados apresentados nas Tabelas 3A a 3E.

A Tabela 3A descreve as regiões do polipéptido Sp35 que estão ligadas por certos anticorpos de comprimento total derivados de uma biblioteca de fagos. Estes anticorpos têm as mesmas regiões variáveis que os fragmentos Fab derivados da Biblioteca de Fagos-1, tal como indicado na Tabela 3B (por exemplo, D05 na Tabela 3A tem a mesma região variável que Li05 na Tabela 3B, D06 na Tabela 3A tem a mesma região variável que Li06 no Quadro 3B, etc.). Os anticorpos foram testados quanto à ligação a fragmentos Sp35 tal como definidos na Tabela 3A, utilizando métodos bem conhecidos na técnica.

As Tabelas 3B-3E descreve a capacidade dos referidos anticorpos monoclonais ou fragmentos Fab para detectar Sp35 em diversos ensaios, tais como: selecção celular activada por fluorescência (FACS), imunoprecipitação (IP), análise de "Western blot", imuno-histoquímica (IHC) e Ensaio de imunossorção associado a enzima (ELISA). Protocolos detalhados para a realização destes ensaios são aqui descritos ou são bem conhecidas e compreendidas pelos competentes na técnica. Os anticorpos monoclonais derivados de hibridoma listados nas Tabelas 3B e 3C foram produzidos por injeção de Sp35 solúvel em ratinhos e, em de seguida isolados usando tecnologia de hibridoma que é bem conhecida na técnica e aqui descrita. Os anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpo Fab listados na Tabela 3B foram isolados a partir de duas bibliotecas de apresentação de fagos diferentes, utilizando técnicas conhecidas na técnica.

TABELA 3A

Fragment o Sp35	D03 (Li03 Região Variável 1)	D05 (Li05 Região Variável)	D06 (Li06 Região Variável)	D08 (Li08 Região Variável)	D11 (Li03 Região Variável 1)	D13 (Li13 Região Variável 1)	D33 (Li33 Região Variável 1)
1-432 Fc de rato	+	+	+	-	+	-	+
417-493 Fc de rato	-	+/-	+/-	-	-	-	-
AP-Sp35 (1-419)	N/D	+	-/+	-/+	N/D	N/D	N/D
AP-Sp35 (418- 498)	N/D	-	-	-	N/D	N/D	N/D
417-498 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-
417-503 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-
363-498 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-
244-498 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 3B - ANTICORPOS MONOCLONAIS DE SP35

ANTICORPOS MONOCLONAIS DERIVADOS DE HIBRIDOMA							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	Sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de camundongo/rato
201'				sim		sim	Não (camundongo e rato)
3A3	-	-	+	-	..	não	Não (camundongo e rato)
3A6	++	+/-	++	+++	-/+	não	Não (camundongo e rato)
1A7	++	-	++	+++	-/+	não	Não (camundongo e rato)
1G7	++	+/-	++	+++	+	não	Não (camundongo e rato)
2B10	++	+/-	+	+++	-/+	não	Não (camundongo e rato)
2C11	-	-	-	-	-	não	Não (camundongo e rato)
2F3	+/-	+/-		+++	+++	sim	sim com mSp35 supraexpresso
3P1B1.1F9				+++	-		
3P1D10.2C3				+++	-		
3P1E11.3B7				+++	-		
3P2C6.3G10.2H7				+++	-		
3P2C9.2G4				+++	-		
3P4A6.1D9				+++	-		
3P4A1.2B9				+++	-		
3P4C2.2D2				+++	+++		
3P4C5.1D8				+++	-		
3P4C8.2G9				+++			Sim (camundongo)
7P1D5.1G9 (ATCC: PTA-8107)	+	+		+++		sim	Não (camundongo)
1B6.4	+++	+++		+++ (banda mais superior)	+++ (banda inferior)	não	Não (camundongo)
2C7.2	+++	+++		+++ (banda mais superior)	+++ (banda inferior)	não	Não (camundongo)
2D6.1	++ (liga a 293 células)	++ (liga a 293 células)		-	-	não	Não (camundongo)

continuação

2F7.3	++	++		+++ (banda inferior)	Sim		Sim (camundongo)
2H3.2	++	++		+++ (banda inferior)	Sim		Sim (camundongo)
3C11.1	++	++		+++ (banda inferior)	Sim		Sim (camundongo)
3E3.1	+++	+++		+++ (banda mais superior)	Sim		Sim (camundongo)
3H11.2	++	++		+++ (banda inferior)	sim		Sim (camundongo)
3G8.1	+	+		+++ (banda mais superior)	+++	não	Não (camundongo)
2B8.1	++	++		+++ (banda mais superior)	+ (banda inferior)	Não	Não (camundongo)
3B5.2 (ATCC: PTA- 8106)	+++	+++		+++ (banda mais superior)	+++	não	Não (camundongo)

TABELA 3B - ANTICORPOS MONOCLONAIS DE SP35 (continuação)

ANTICORPOS MONOCLONAIS DERIVADOS DE HIBRIDOMA									
	IHC em células Transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	417-493	419-495	1-532	34-532
201'	N/A	N/A	Sim	Sim					
3A3	não	não			Sim			Sim	
3A6	sim c/base	não							
1A7	sim c/base	não					+/-	Sim	Sim
1G7	sim c/base	não						Sim	
2B10	sim c/base	não			Sim			Sim	
2C11	não	não							
2F3	sim	sim	Sim	Sim	Sim			Sim	
3P1B1.1F9									
3P1D10.2C3							+/-	Sim	Sim
3P1 E11.3B7							+/-	Sim	Sim
3P2C6. 3G10.2H7							+/-	Sim	Sim
3P2C9.2G4							+/-	Sim	Sim
3P4A6.1D9							+/-	Sim	Sim
3P4A1.2B9									
3P4C2.2D2					Sim			Sim	
3P4C5.1D8							+/-	Sim	Sim
3P4C8.2G9					Sim			Sim	
7P1 D5.1G9 (ATCC: PTA-8107)									
1B6.4									
2C7.2									
2D6.1									
2F7.3									
2H3.2									
3C11.1									
3E3.1									
3H11.2									
3G8.1									
2B8.1									
3B5.2 (ATCC: PTA-8106)									

TABELA 3B - ANTICORPOS MONOCLONAIS DE SP35 (continuação)

FRAGMENTOS DE Fab MONOCLONAIS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-1							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	Sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	sp35 de camundongo/rato
30-C12 (Li01)				++	++		
38-D01 (Li02)				-/+	-/+		
35-E04 (Li03)				++	+++		
36-C09 (Li04)				-/+	-/+		
30-A11 (Li05)	+		++	++	++		
34-F02 (Li06)				++	++		
29-E07 (Li07)				++	++		
34-G04 (Li08)	+/-		+	++	++		
36-A12 (Li09)				-	-		
28-D02 (Li10)				-/+	+/-		
30-B01 (Li11)	++			++	++		
34-B03 (Li12)				+	+		
30-C12 (Li01)							
38-D01 (Li02)							
35-E04 (Li03)							
36-C09 (Li04)							
30-A11 (Li05)							
34-F02 (Li06)							
29-E07 (Li07?)							
34-G04 (Li08)							
36-A12 (Li09)							
28-D02 (Li10)							
30-B01 (Li11)							
34-B03 (Li12)							

TABELA 3B - ANTICORPOS MONOCLONAIS DE Sp35 (continuação)

FRAGMENTOS DE Fab MONOCLONAIS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-2							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	Sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de camundongo/rato
3383 (1)	+	-					
3495 (2)	+	-				sim	não
3563 (3)	+						
3564 (4)	+						
3565 (5)	+						
3566 (6)	+						
3567 (7)	+						
3568 (8)	+						
3569 (9)	+						
3570 (10)	+						
3571 (11)	+						
3582 (12)	+						
1968 (13)	+/-	-		++		fraco	não
3011	-			+/-			
3012	-			-			
3013	pegajos o			+			
3418	pegajos o						
3422	-						
3562	pegajos o						

TABELA 3B - ANTICORPOS MONOCLONAIS DE Sp35 (continuação)

FRAGMENTOS DE Fab MONOCLONAIS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-2									
	IHC células Transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafi - na)	KO (parafi - na)	34- 417	417- 493	419 - 495	1- 532	34- 532
3383 (1)	N/A	N/A	sim	sim	sim			sim	
3495 (2)	tênue	N/A	sim	sim			+/-	sim	sim
3563 (3)	não	não			sim			sim	
3564 (4)	não	não			sim			sim	
3565 (5)	não	não			sim			sim	
3566 (6)	sim	muito tênue	sim	sim			+/-	sim	sim
3567 (7)	sim	não	sim	sim			+/-	sim	sim
3568 (8)	não	não			sim			sim	
3569 (9)	não	não			sim			sim	
3570 (10)	não	não			sim			sim	
3571 (11)	não	não							
3582 (12)	não	não			sim			sim	
1968 (13)	muito tênue	sim c/ bg	sim	sim			+/-	sim	sim
3011	apenas colora- ção de pouquissi- mas células	tênue							
3012	Não	Não							
3013	Sim c/bg alto	Sim							
3418	Sim c/bg alto	Sim							
3422	Muito tênue	Sim c/bg alto							
3562	não	não							

TABELA 3B - ANTICORPOS MONOCLONAIS DE Sp35 (continuação)

ANTICORPOS MONOCLONAIS COMPLETOS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-1							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	Sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de camundongo/rato
D05	++						
D07	+++						
D08	++						
D10	+++						
D11	+++						

TABELA 3B - ANTICORPOS MONOCLONAIS DE Sp35 (continuação)

ANTICORPOS MONOCLONAIS COMPLETOS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-1									
	IHC células Transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafi- - na)	KO (parafi- na)	34- 417	417- 493	419- 495	1- 532	34- 532
D05									
D07									
D08									
D10									
D11									

Legenda:

huSp35 = proteína humana Sp35

mSp35 = proteína de Sp35 de camundongo

WT = tipo selvagem

KO = sedação

IHC = imunoistoquímica

FACS = Classificação de Célula Ativada Fluorescente

TABELA 3C - ANTICORPOS MONOCLONAIS DE Sp35 DERIVADOS DE HIBRIDOMA

Anticorpo	espécies	subtipo		ELISA					FACS		IP		
				hLIN- GO-1	LR R	l g	mLIN- GO-1	hL IN - GO-2	hLI N- GO-1	mLIN- GO-1	hLI N- GO-1	mLI N- GO-1	Homogeneizado o Cérebro o rato
385.2 (ATCC: PTA-8106)	Murino		mAb	+++	+	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	
7P1D5.1G9 (ATCC: PTA-8107)	murino	IgG1/capa	Fab	+			+		+		+++	+++	
			mAb	++	+	-	+++	-	+++		+++	+++	sim

TABELA 3D

Anticorpo	Especies	Subtipo		ELISA				
				hLINGO-1	LRR	lg	mLING-01	hLINGO-2
1A7	murino	IgG1/kappa	Fab	+			+/-	
			mAb	+++	-	-	+/-	-
2F3	murino	IgG2a	Fab					
			mAb	++	++		++	+/-
3P1D10.2C3	murino	IgG1	mAb	+++	-	-	-	
3P1E11.3B7	murino	IgG1	mAb	+++	-	-	-	
6P4F4.1D3	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	+++	-	+++	-
6P4F4.1F9	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	+++	-	+++	-
7P1D5.1G9 (ATCC PTA-8107)	murino	IgG1/kappa	Fab	+		-	+	
			mAb	++	+		+++	-
1B6.4	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	++	-	+++	-
2C7-2	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	++	-	+++	+
2D6.1	murino	IgG1/kappa	mAb	-	-	-	-	-
2F7.3	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	-	-	+++	-
2H3.2	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	-	-	+++	-
3C11.1	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	-	-	+++	-
3E3.1	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	++	-	+++	-
3H11.2	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	-	-	+++	-
3G8.1	murino		mAb	+++	++	-	+++	-
2B8.1	murino		mAb	+++	++	-	+++	-
3B5.2 (ATCC: PTA-8106)	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	+	-	+++	-
3P3C10.2	murino		mAb	+++	+	-	+++	-
3P4F4.6	murino		mAb	+++	+	-	+++	-

TABELA 3D (continuação)

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
1A7	murino	IgG1/kappa	Fab			1nM	-
			mAb	+++	-		
2F3	murino	IgG2a	Fab			0,7 nM	-
			mAb	+/-	+/-		
3P1D10.2C3	murino	IgG1	mAb				
3P1E11.3B7	murino	IgG1	mAb				
6P4F4.1D3	murino	IgG1/kappa	mAb				
6P4F4.1F9	murino	IgG1/kappa	mAb				
7P1D5.1G9 (ATCC PTA-8107)	murino	IgG1/kappa	Fab	+		(10,4) nM	3,7 nM
			mAb	+++		2,7 nM	1 nM
1B6.4	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	+++		
2C7.2	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	+++		
2D6.1	murino	IgG1/kappa	mAb	++ (*)	++ (*)	-	
2F7.3	murino	IgG1/kappa	mAb	++	++		
2H3.2	murino	IgG1/kappa	mAb	++	++		
3C11.1	murino	IgG1/kappa	mAb	++	++		
3E3.1	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	+++		
3H11.2	murino	IgG1/kappa	mAb	++	++		
3G8.1	murino		mAb	+	+		
2B8.1	murino		mAb	++	++	5,4 nM	
3B5.2 (ATCC: PTA-8106)	murino	IgG1/kappa	mAb	+++	+++	<0,4 nM	0,4 nM
3P3C10.2	murino		mAb			5,1 nM	4,4 nM
3P4F4.6	murino		mAb			4,6 nM	6 nM

Tabela 3D (continuação)

Anticorpo	Especies	Subtipo		ELISA			
				hLINGO-1	LRR	lg	mLINGO1
30-C12 (Dli01)	humano	Kappa	Fab	++	+	-	
38-D01 (Dli02)	humano	lambda	Fab	+	-	-	
35-E04 (Dli03)	humano	Kappa	Fab	+++	+	-	+++
			Ab				
36-C09 (Dli04)	humano		Fab	+	-	-	
30-A11 (Dli05)	humano	lambda	Fab	+++	+(CG), ++ (ZS)	-	+++
			Ab				
34-F02 (Dli06)	humano	Kappa	Fab	++	+(CG, +/-) (ZS)	-	++
			Ab				
29-E07 (Dli07)	humano	lambda	Fab	++	+	+/-	
34-G04 (Dli08)	humano	kappa	Fab	-(CG), ++ (ZS)	-(CG, +/-) (ZS)	-	+
			Ab				
36-A12 (Dli09)	humano	Kappa	Fab	-	-	-	
28-D02 (Dli10)	humano	Kappa	Fab	++	-	-	
			Ab				
30-B01 (Dli11)	humano	Kappa	Fab	+++	+	-	
			Ab				
34-B03 (dli12)	humano		Fab	++	+/-	-	
72-D03 (Dli13)	humano		Fab	++++	-	-	++++
			Ab				
73-C08 (Dli17)	humano		Fab	+++	-	-	+++
74-E08 (Dli21)	humano		Fab	+++	+	-	+++

75-H04 (Dli 24)	humano		Fab	++++	–	–	++++
76-F10 (Dli28)	humano		Fab	++++	+	–	++++
79-G02 (Dli32)	humano		Fab	++++	+	–	++++
80-A08 (Dli33)	humano		Fab	++++	++	–	++++
80-D02 (Dli34)	humano		Fab	+++++	++	–	+++++
			Ab				
81-C01 (Dli36)	humano		Fab	++++	++	–	++++
74-D05 (Dli39)	humano		Fab	++++			++++
74-F02 (Dli40)	humano		Fab	++++			++++
75-B09 (Dli42)	humano		Fab	++++			++++

Tabela 3D (continuação)

Anticorpo	Especie s	Subtipo		ELISA			
				hLINGO-1	LRR	lg	mLINGO1
94-E07 (Dli54)	humano		Fab	++++			
98-B10 (Dli55)	humano		Fab	++++			
544L-M0054- E03 (Dli62)	humano		Fab	++++			
		IgG1Agly	Ab				
544L-M0059- G09 (Dli64)	humano		Fab	++++			
544L-M0063- G06 (Dli64)	humano		Fab	++++			
544L-M0069- D12 (Dli65)	humano		Fab	++++			
544L-M0070- H12 (Dli67)	humano		Fab	++++			
544L-M0090- E09 (Dli73)	humano		Fab	++++			
		IgG1Agly	Ab				
544-LM0090- E12 (Dli74)	humano		Fab	++++			
544L-M0090- F08 (Dli75)	humano		Fab	++++			
544L-M0104- B01 (Dli77)	humano		Fab	++++			
544L-M0120- E08 (Dli81)	humano		Fab	++++			
		IgG1Agly	Ab	0,25 nM			0,27 nM

TABELA 3D (Continuação)

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
				hLINGO-1	mLINGO-1	hLINGO1	mLINGO1
30-c12 (Dli01)	humano	Kappa	Fab				
38-D01 (Dli02)	humano	Lambda	Fab				
35-E04 (Dli03)	humano	Kappa	Fab				
			Ab				
36-C09 (Dli04)	humano		Fab				
30-A11 (Dli05)	humano	Lambda	Fab	+		22,8 nM	
			Ab	++		Sem adaptação	5,5 nM
34-F02 (Dli06)	humano	Kappa	Fab			21 nM	> 200 nM
			Ab			2,32 nM	26,6 nM
29-E07 (Dil07)	humano	Lambda	Fab				
34-G04 (Dil08)	humano	Kappa	Fab	+/-		206 nM	190 nM
			Ab	++		3,3 nM	18,6 nM
36-A12 (Dil09)	humano	kappa	Fab				
28-D02 (Dli10)	humano	Kappa	Fab				
			Ab	+++			<400 nM
30-B01 (Dli11)	humano	kappa	Fab	++			
			Ab	+++			

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
				hLINGO-1	mLINGO-1	hLINGO1	mLINGO1
34-B03- (Dli12)	humano		Fab			0,74 nM 3,2 (CG)	24,7 nM
72-D03 (Dli13)	humano		Fab				
			Ab				
73-C08 (Dli17)	humano		Fab				
74-E08 (Dli21)	humano		Fab				
75-H04 (Dli24)	humano		Fab				
76-F10 (Dli28)	humano		Fab				
79-G02 (Dli32)	humano		Fab				
80-A08 (Dli33)	humano		Fab			1,39 nM, 4 (CG)	Sem adaptação
			Ab				
80-D02 (Dli34)	humano		Fab				
			Fab				
81-C01 (Dli36)	humano		Fab				
74-D05 (Dli39)	humano		Fab			7,6 nM (CG)	
74-F02 (Dli40)	humano		Fab			11 nM (CG)	
75-B09 (Dli42)	humano		Fab			28 nM (CG)	

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
				hLINGO-1	mLINGO-1	hLINGO1	mLINGO1
94-E07 (Dli54)	humano					33 nM (CG)	
98-B10 (Dli55)	humano					50 nM (CG)	
544L-M0054-E03 (Dli62)	humano						
		IgG1Agly	Ab			0,261 nM	
544L-M0059-G09 (Dli63)	humano						
544L-M0063-G06 (Dli64)	humano						
544L-M0069-D12 (Dli65)	humano						
544L-M0070-H12 (Dli67)	humano						
544L-M0090-E09 (Dli73)	humano						
		IgG1Agly	Ab			0,12 nM	
544L-M0090-E12 (Dli74)	humano						
544L-M0090F08 (Dli75)	Humano		Fab				
544L-M0104B01 (Dli77)	Humano		Fab				
544L-M0120E08 (Dli81)	humano		Fab				
		IgG1 Agly	Ab			0,156 nM	

TABELA 3E

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	Roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
1A7	murino	IgG1/capa	Fab	+++ (U)	+/-				
			mAb	+++ (U)	+/-		Sim		
2F3	murino	IgG2a	Fab						
			mAb	+++ (L)	+/-	não	não	Sim (fraca)	+++
3P1D10.2C3	murino	IgG1	mAb						
3P1E11.3BT	murino	IgG1	mAb						
6P4F4.1D3	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (U)	+++				
6P4F4.1F9	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (U)	+++				
7P1D5.1G9 (ATCC PTA-8107)	murino	IgG1/kappa	Fab	+++ (U)	+++				
			mAb	+++ (U)	+++ (L)	Sim	Sim		

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	Roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
1B6.4	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (U)	+++ (L)	sim			
2C7.2	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (U)	+++ (L)		Sim		
2D6.1	murino	IgG2/kappa	mAb	-	-			não	
2F7.3	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (L)	+++ (L)		não		
2H3.2	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (L)	+++ (L)		não	não	
3C11.1	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (L)	+++ (L)	Sim (fraco)	não		
3E3.1	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (U)	+++ (L)	Sim	sim	não	
3h11.2	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (L)	+++ (L)		não		

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	Roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
3G8.1	murino		mAb	+++ (U)	+++		Sim		
2B8.1	murino		mAb	+++ (U)	+ (L)		Sim		
3B5.2 (ATCC: PTA/8106)	murino	IgG1/kappa	mAb	+++ (U)	+++	Sim	Sim		
3P3C10.2	murino		mAb						
3P4F4.6	murino		mAb						
30-C12 (Dli01)	Human	kappa	Fab	++	++				
38-D01 (Dli02)	Human	lambda	Fab	+/-	+/-				
35-E04 (Dli03)	human	Kappa	Fab	++	+++	não		não	
			Ab						

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	Roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
36-C09 (Dli04)	Humano		Fab	-/+	-/+				
30-A11 (Dli05)	humano	lambda	Fab	++	++				
			Ab	++ (U)	+ + (L)	Sim			
34-F02 (Dli06)	humano	kappa	Fab	++	++				
			Ab						
29-E07 (Dli07)	humano	lambda	Fab	++	++				
34-G04 (Dli08)	humano	kappa	Fab	++	++				
			Ab	++ (U)	++ (L)				
36-A12 (Dli09)	humano	Kappa	Fab	-	-				
28-D02 (Dli10)	Humano	Kappa	Fab	-/+	+/-				
			Ab						
30-B01 (Dli11)	Humano	Kappa	Fab	+ + (U)	+ + (L)				
			Ab			Sim		Não	+
34-B03 (Dli12)	humano		Fab	+	+				
72-D03 (Dli13)	Humano		Fab	++ (U)	++ (L)	não			
			Ab						+ +
73-C08 (Dli17)	Humano		Fab						
74-E08 (Dli21)	humano		Fab						

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	Roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
75-H04 (Dli24)	Humano		Fab						
76-F10 (Dli28)	Humano		Fab						
79-G02 (Dli32)	humano		Fab						

80-A08 (Dli33)	Humano		Fab Ab	++ (banda mais superior)	++ (L)	Sim (fraco)		
							+++	+
80-D02 (Dli34)	humano		Fab Ab	++ (U)	++ (L)			
							+++	+++

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	Roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
81-C01 (Dli36)	humano		Fab						
74-D05 (Dli39)	humano		Fab						
74-F02 (Dli40)	humano		Fab						
75B09 (Dli42)	humano		Fab						
94-E07 (Dli54)	humano		Fab						
98-B10 (dli55)			Fab						
544L-M0054-E03 (Dli62)		IgG1A gly	Fab Ab						

continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	Roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
544L-M0059-G09 (Dli63)	humano		Fab						
544L-M0063-G06 (Dli64)	humano		Fab						
544L-M0069-D12 (Dli65)	humano		Fab						
544L-M0070-H12 (Dli67)	humano		Fab						
544L-M0090-E09 (Dli73)		IgG1A	Fab						
			Ab						

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	Roedor endógeno	bloqueio	congelada	Parafina
544L-M0090-E12 (Dli74)	Humano		Fab						
544L-M0090-F08 (Dli75)	Humano		Fab						
544L-M0104-B01 (Dli77)	humano		Fab						
544L-M0120-E08 (Dli81)	humano		Fab						
			Ab	Sim	sim	sim			

TABELA 3E (Continuação)

Anticorpo	Espécie	Subtipo		Mielinação em cocultura	Desenvolvimento de neurite	SCI	Esmagamento do nervo óptico	Cuprizona	Lisolecitina
1A7	murino	IgG1/kappa	Fab	Sim	Sim	Sim?	Sim	Sim	Sim
			mAb		Sim	Não			
2F3	murino	IgG2a	Fab						
			mAb						
3P1D10.2C3	murino	IgG1	mAb						
3P1E11.3B7	murino	IgG1	mAb						
6P4F4.1D3	murino	IgG1/kappa	mAb						
6P4F4.1F9	murino	IgG1/kappa	mAb						
7P1D5.1G9 (ATCC PTA - 8107)	murino		Fab						sim
			mAb						Não?
1B6.4	murino	IgG1/kappa	mAb						
2C7.2	murino	IgG2/kappa	mAb						
2D6.1	murino	IgG2/kappa	mAb						
2F7.3	murino	IgG1/kappa	mAb						
2H3.2	murino	IgG1/kappa	mAb						

Continuação

Anticorp o	Espécies	Subtip o		Miel inaç ã em cocu ltur a	Desenvolvime nto de neurite	SC I	Esmagamen to do nervo óptico	Cupriz ona	Liso- leciti na
3C11.1	murino	IgG1/k appa	mAb	Sim					
3E3.1	murino	IgG1/k appa	mAb	Não					
3H11.2	murino	IgG1/k appa	mAb	Não					
3G8.1	murino		mAb	Não		Si m			
2B8.1	murino								
3B5.2 (ATCC: PTA/8106)	murino	IgG1/k appa	mAb	sim	sim	si m			
3P3C10.2	murino			mAb					
3P4F4.6	murino			mAb					
30-C12 (DLI01)	Humano	kappa		Fab					
38-D01 (Dli02)	Humano	lambda		Fab					
35-E04 (Dli03)	humano	kappa		Fab Ab					
36-C09 (Dli04)	Humano		Fab						
30-A11 (Dli05)	humano	lambda	Fab	Sim					Sim
			Ab	Sim					Sim

Continuação

Anticorp o	Espéci es	Subtip o		Miel inaç ã em cocu ltur a	Desenvolvime nto de neurite	SC I	Esmagam ento do nervo óptico	Cuprizon a	Liso- leciti na
34-F02 (Dli06)	humano	Kapa	Fab	Sim					
			Ab	sim					
29-E07 (Dli07)	humano	Lambda	Fab						
34-G04 (Dli08)	humano	kapa	Fab	sim					Sim
			Ab	Sim					Sim/nã o
36-A12 (Dli09)	humano	Kapa	Fab						
28-D02 (Dli10)	humano	kapa	Fab						
			Ab						
30-B01 (Dli11)	humano	Kapa	Fab						
			Ab	não					
34-B03 (Dli12)	humano		Fab						
72-D03 (Dli13)	humano		Fab	sim					sim
			Ab						

Continuação

Antico rpo	Espécies	Subtip o		Miel inaç ã em cocu ltur a	Desenvolvime nto de neurite	SC I	Esmagam ento do nervo óptico	Cuprizon a	Liso- leciti na
73-C08 (Dli17)	humano		Fab						
74-E08 (Dli21)	humano		Fab						
75-H04 (Dli24)	humano		Fab	Não					
76-F10 (Dli28)	humano		Fab	sim					
79-G02 (Dli32)	humano		Fab						
80-A08 (Dli33)	humano		Fab	Sim					Sim
			Ab						Sim
80-D02 (Dli34)	humano		Fab	não					
			Ab						
81-C01 (Dli36)	humano		Fab	não					
74-005 (Dli39)	humano		Fab						
74-F02 (Dli40)	humano		Fab						
75-B09 (Dli42)	humano		Fab						
94-E07 (Dli54)	humano		Fab						
98-B10 (Dli55)	humano		Fab						

Continuação

Anticorp o	Espéci es	Subtip o		Miel inaç ã em cocu ltur a	Desenvolvi mento de neurite	SCI	Esmagamen to do nervo óptico	Cupriz ona	Liso- lecitina
544L- M0054- E03 (Dli6 2)	humano	IgG1 Agly	Fab	Sim					
			Ab	Sim					
544L- M0059- G09 (Dli6 3)	humano		Fab	não					
544L- M0063- G06 (Dli6 4)	humano		Fab	não					
544L- M0069- D12 (Dli6 5)	humano		Fab	Sim					
544L- M0070- H12 (Dli6 7)	humano		Fab	Sim					
544L- M0090- E09 (Di73)	humano	IgG1Ag ly	Fab	Sim					
			Ab	Sim					

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		Mielinação em cocultura	Desenvolvimento de neurite	SC I	Esmagamento do nervo óptico	Cuprizona	Lisolecitina
544L-M0090-E12 (Dli74)	Humano		Fab	não					
544L-M0090-F08 (Dli75)	Humano		Fab	não					
544L-M0104-B01 (Dli77)	humano		Fab	Sim					
544L-M0120-E08 (Dli81)	humano	IgG1Agly	Fab	Sim					
			Ab	sim					Sim

Tal como aqui utilizado, o termo "domínio de ligação ao antigénio" inclui um local que se liga especificamente a um epitopo de um antigénio (por exemplo, um epitopo de Sp35). O domínio de ligação ao antigénio de um anticorpo tipicamente inclui pelo menos uma porção de uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina e de pelo menos uma porção de uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina. O local de ligação formada por estas regiões variáveis determina a especificidade do anticorpo.

A presente divulgação é dirigida, mais especificamente, a um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante ou derivado, onde o anticorpo SP35 se liga ao mesmo epitopo que um anticorpo monoclonal seleccionado a partir do grupo consistindo em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81.

A divulgação é ainda direccionada para um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante ou derivado, em que o anticorpo inibe competitivamente um anticorpo monoclonal Sp35 seleccionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02

(Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13) 7P1D5.1G9, 3B5.2 E Li81 de se ligar a Sp35.

A divulgação também se dirige a um anticorpo Sp35, ou a um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante ou derivado, onde o anticorpo Sp35 compreende pelo menos a região de ligação ao antigénio de um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 7P1D5.1GB9, 3B5.2 e Li81.

Em 27 de dezembro de 2006, os seguintes hibridomas foram depositados na American Type Culture Collection (ATCC) em Manassas, VA: 2.P3B5.2 (ATCC PTA-Depósito Designação 8106), 7.P1D5.1.G9 (ATCC Depósito Designação PTA-8107). O hibridoma depositado 2.P3B5.2 produz o anticorpo monoclonal 3B5.2, aqui descrito e hibridoma depositado 7.P1D5.1.G9 produz o anticorpo monoclonal 7P1D5.1.G9, aqui descrito descrito. Os hibridomas podem ser cultivados de acordo com métodos bem conhecidos na técnica e aqui descritos.

Nalguns exemplos, a presente divulgação é dirigida a um anticorpo, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, que se liga especificamente ou

preferencialmente a um determinado domínio ou fragmento de polipéptido de SP35 domínio. Tais fragmentos de polipéptido de Sp35 incluem, mas não estão limitados a, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste nos aminoácidos 34 a 532; 34 a 417; 34 a 425; 34 a 493; 66 a 532; 66 a 417; 66 a 426; 66 a 493; 66 a 532; 417 a 532; 417 a 425 (a região Sp35 básica) ; 417 a 493; 417 a 532;; 419 a 493 (a região Ig Sp35);, ou 425 a 532 de SEQ ID NO: 2; ou polipéptido Sp35 variante pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% idêntico aos aminoácidos 34 a 532; 34 a 417; 34 a 425; 34 a 493; 66 a 532; 66 a 417; 66 a 426; 66 a 493; 66 a 532; 417 a 532; 417 a 425 (a região Sp35 básica) ; 417 a 493; 417 a 532; 419 a 493 (a região Ig Sp35); ou 425 a 532 de SEQ ID NO: 2.

Os fragmentos de péptidos SP35 adicionais aos quais se ligam certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação incluem, mas não estão limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo num ou mais repetições ricas em leucina-se (LRR) de SP35. Tais fragmentos, incluem, por exemplo, fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente de ou consistindo nos aminoácidos 66 a 89; 66 a 113; 66 a 137; 90 a 113; 114 a 137; 138 a 161; 162 a 185; 186 a 209; 210 a 233;; 234 a 257; 258 a 281; 282 a 305; 306 a 329; ou 330 a 353 de SEQ ID NO: 2. São também contemplados os fragmentos correspondentes de uma variante do polipéptido Sp35 pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% idênticos aos aminoácidos 66 a 89; 66 a 113; 90 a 113; 114 a 137; 138 a 161; 162 a 185; 186 a 209; 210 a 233; 234 a 257; 258 a 281; 282 a 305; 306 a 329; ou 330 a 353 de SEQ ID NO: 2 são também contemplados.

Fragmentos de péptidos de Sp35 adicionais aos quais se ligam certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes, ou derivados da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a esses fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo numa ou mais regiões ricas em cisteína que flanqueia a LRR de Sp35. Tais fragmentos, incluem, por exemplo, um fragmento que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste nos aminoácidos 34 64 da SEQ ID NO: 2 (a extremidade N da região que flanqueia LRR (LRRNT)), ou um fragmento que compreende, que consiste essencialmente de, ou que consiste nos aminoácidos 363 416 da SEQ ID NO: 2 (a extremidade C LRR da região que flanqueia (LRRCT)), estando também contemplados os aminoácidos correspondentes de fragmentos de um polipéptido variante SP35, pelo menos, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90% ou 95% idênticos aos aminoácidos 34 a 64 e 363 a 416 da SEQ ID NO: 2 são também contemplados.

Como é conhecido na técnica, a "identidade de sequência" entre dois polipéptidos é determinada pela comparação da sequência de aminoácidos de um polipéptido com a sequência de um segundo polipéptido. Quando aqui discutido, se qualquer polipéptido em particular é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a outro polipéptido pode ser determinado utilizando os métodos e programas de computador/software conhecidos na técnica tais como, mas não limitados a, o programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). O BESTFIT usa o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), para encontrar o melhor segmento de homologia entre duas sequências. Ao utilizar BESTFIT ou qualquer outro programa de alinhamento de sequências para determinar se uma sequência em

particular é, por exemplo, 95% idêntica a uma sequência de referência de acordo com a divulgação, os parâmetros são ajustados, naturalmente, de tal modo que a percentagem de identidade é calculada sobre o comprimento total da sequência do polipéptido de referência e em que são permitidas as lacunas de homologia até 5% do número total de aminoácidos na sequência de referência.

Fragmentos de péptidos de Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, mas não estão limitados a esses fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 41 a 525 de SEQ ID NO: 2; 40 a 526 de SEQ ID NO: 2; 39 a 527 de SEQ ID NO: 2; 38 a 528 de SEQ ID NO: 2; 37 a 529 de SEQ ID NO: 2; 36 a 530 de SEQ ID NO: 2; 35 a 531 de SEQ ID NO: 2; 34 a 531 de SEQ ID NO: 2; 46 a 520 de SEQ ID NO: 2; 45 a 521 de SEQ ID NO: 2; 44 a 522 de SEQ ID NO: 2; 43 a 523 de SEQ ID NO: 2; e 42 a 524 de SEQ ID NO: 2.

Adicionalmente ainda fragmentos peptídicos Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, mas não estão limitados a esses fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 1 a 33 de SEQ ID NO: 2; 1 a 35 de SEQ ID NO: 2; 34 a 64 de SEQ ID NO: 2; 36 a 64 de SEQ ID NO: 2; 66 a 89 de SEQ ID NO: 2; 90 a 113 de SEQ ID NO: 2; 114 a 137 de SEQ ID NO: 2; 138 a 161 de SEQ ID NO: 2; 162 a 185 de SEQ ID NO: 2; 186 a 209 de SEQ ID NO: 2; 210 a 233 de SEQ ID NO: 2; 234 a 257 de SEQ ID NO: 2; 258 a 281 de SEQ ID NO: 2; 282 a 305 de SEQ ID NO: 2; 306 a 329 de SEQ ID NO: 2; 330 a 353 de SEQ ID NO: 2; 363 a 416 de SEQ ID NO: 2; 417 a 424 de SEQ ID NO: 2; 419 a 493 de SEQ ID NO: 2; e 494 a 551 de SEQ ID NO: 2.

Mais ainda, fragmentos peptídicos Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, mas não estão limitados a esses fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 1 a 33 de SEQ ID NO: 2; 1 a 35 de SEQ ID NO: 2; 1 a 64 de SEQ ID NO: 2; 1 a 89 de SEQ ID NO: 2; 1 a 113 de SEQ ID NO: 2; 1 a 137 de SEQ ID NO: 2; 1 a 161 de SEQ ID NO: 2; 1 a 185 de SEQ ID NO: 2; 1 a 209 de SEQ ID NO: 2; 1 a 233 de SEQ ID NO: 2; 1 a 257 de SEQ ID NO: 2; 1 a 281 de SEQ ID NO: 2; 1 a 305 de SEQ ID NO: 2; 1 a 329 de SEQ ID NO: 2; 1 a 353 de SEQ ID NO: 2; 1 a 416 de SEQ ID NO: 2; 1 a 424 de SEQ ID NO: 2; 1 a 493 de SEQ ID NO: 2; 1 a 551 de SEQ ID NO: 2; 1 a 531 de SEQ ID NO: 2 e 1 a 532 de SEQ ID NO: 2.

Fragmentos de péptidos Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, mas não estão limitados a esses fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste nos aminoácidos 34 a 64 de SEQ ID NO: 2; 34 a 89 de SEQ ID NO: 2; 34 a 113 de SEQ ID NO: 2; 34 a 137 de SEQ ID NO: 2; 34 a 161 de SEQ ID NO: 2; 34 a 185 de SEQ ID NO: 2; 34 a 209 de SEQ ID NO: 2; 34 a 233 de SEQ ID NO: 2; 34 a 257 de SEQ ID NO: 2; 34 a 281 de SEQ ID NO: 2; 34 a 305 de SEQ ID NO: 2; 34 a 329 de SEQ ID NO: 2; 34 a 353 de SEQ ID NO: 2; 34 a 416 de SEQ ID NO: 2; 34 a 424 de SEQ ID NO: 2; 34 a 493 de SEQ ID NO: 2; e 34 a 551 de SEQ ID NO: 2.

Mais fragmentos de péptidos Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, mas não estão limitados àquelas fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste nos aminoácidos 34 a 530 de SEQ ID NO: 2; 34 a 531 de SEQ ID NO:

2; 34 a 532 de SEQ ID NO: 2; 34 a 533 de SEQ ID NO: 2; 34 a 534 de SEQ ID NO: 2; 34 a 535 de SEQ ID NO: 2; 34 a 536 de SEQ ID NO: 2; 34 a 537 de SEQ ID NO: 2; 34 a 538 de SEQ ID NO: 2; 34 a 539 de SEQ ID NO: 2; 30 a 532 de SEQ ID NO: 2; 31 a 532 de SEQ ID NO: 2; 32 a 532 de SEQ ID NO: 2; 33 a 532 de SEQ ID NO: 2; 34 a 532 de SEQ ID NO: 2; 35 a 532 de SEQ ID NO: 2; 36 a 532 de SEQ ID NO: 2; 30 a 531 de SEQ ID NO: 2; 31 a 531 de SEQ ID NO: 2; 32 a 531 de SEQ ID NO: 2; 33 a 531 de SEQ ID NO: 2; 34 a 531 de SEQ ID NO: 2; 35 a 531 de SEQ ID NO: 2; e 36 a 531 de SEQ ID NO: 2.

Mais ainda, fragmentos de péptidos Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, mas não estão limitados àquelas fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste nos aminoácidos 36 a 64 de SEQ ID NO: 2; 36 a 89 de SEQ ID NO: 2; 36 a 113 de SEQ ID NO: 2; 36 a 137 de SEQ ID NO: 2; 36 a 161 de SEQ ID NO: 2; 36 a 185 de SEQ ID NO: 2; 36 a 209 de SEQ ID NO: 2; 36 a 233 de SEQ ID NO: 2; 36 a 257 de SEQ ID NO: 2; 36 a 281 de SEQ ID NO: 2; 36 a 305 de SEQ ID NO: 2; 36 a 329 de SEQ ID NO: 2; 36 a 353 de SEQ ID NO: 2; 36 a 416 de SEQ ID NO: 2; 36 a 424 de SEQ ID NO: 2; 36 a 493 de SEQ ID NO: 2; e 36 a 551 de SEQ ID NO: 2.

Fragmentos de péptido Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, mas não estão limitados àquelas fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste nos aminoácidos 36 a 530 de SEQ ID NO: 2; 36 a 531 de SEQ ID NO: 2; 36 a 532 de SEQ ID NO: 2; 36 a 533 de SEQ ID NO: 2; 36 a 534 de SEQ ID NO: 2; 36 a 535 de SEQ ID NO: 2; 36 a 536 de

SEQ ID NO: 2; 36 a 537 de SEQ ID NO: 2; 36 a 538 de SEQ ID NO: 2; e 36 a 539 de SEQ ID NO: 2.

Mais fragmentos de péptido Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, mas não estão limitados às aquelas fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste nos aminoácidos 417 a 493 de SEQ ID NO: 2; 417 a 494 de SEQ ID NO: 2; 417 a 495 de SEQ ID NO: 2; 417 a 496 de SEQ ID NO: 2; 417 a 497 de SEQ ID NO: 2; 417 a 498 de SEQ ID NO: 2; 417 a 499 de SEQ ID NO: 2; 417 a 500 de SEQ ID NO: 2; 417 a 492 de SEQ ID NO: 2; 417 a 491 de SEQ ID NO: 2; 412 a 493 de SEQ ID NO: 2; 413 a 493 de SEQ ID NO: 2; 414 a 493 de SEQ ID NO: 2; 415 a 493 de SEQ ID NO: 2; 416 a 493 de SEQ ID NO: 2; 411 a 493 de SEQ ID NO: 2; 410 a 493 de SEQ ID NO: 2; 410 a 494 de SEQ ID NO: 2; 411 a 494 de SEQ ID NO: 2; 412 a 494 de SEQ ID NO: 2; 413 a 494 de SEQ ID NO: 2; 414 a 494 de SEQ ID NO: 2; 415 a 494 de SEQ ID NO: 2; 416 a 494 de SEQ ID NO: 2; 417 a 494 de SEQ ID NO: 2; e 418 a 494 de SEQ ID NO: 2.

Num exemplo adicional fragmentos peptídicos Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste em péptidos do domínio Ig de Sp35 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos. Especificamente, polipéptidos compreendendo, consistindo essencialmente de ou consistindo nas seguintes sequências polipeptídicas: $ITX_1X_2X_3$ (SEQ ID NO: 287), $ACX_1X_2X_3$ (SEQ ID NO: 288), $VCX_1X_2X_3$ (SEQ ID NO: 289) e $SPX_1X_2X_3$ (SEQ ID NO: 290) em que X_1 é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina, X_2 é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina e X_3 é lisina, arginina, histidina, glutamina ou

asparagina. Por exemplo, fragmentos peptídicos Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente invenção se ligam incluem aqueles fragmentos que compreendem, que consistem essencialmente em, ou que consistem nas seguintes sequências polipeptídicas: SPRKH (SEQ ID NO: 291), SPRKK (SEQ ID NO: 292), SPRKR (SEQ ID NO: 293), SPKKH (SEQ ID NO: 294), SPHKH (SEQ ID NO: 295), SPRRH (SEQ ID NO: 296), SPRHH (SEQ ID NO: 297), SPRRR (SEQ ID NO: 298), SPHHH (SEQ ID NO: 299) SPKKK (SEQ ID NO: 300), LSPRKH (SEQ ID NO: 301), LSPRKK (SEQ ID NO: 302), LSPRKR (SEQ ID NO: 303), LSPKKH (SEQ ID NO: 304), LSPHKH (SEQ ID NO: 305), LSPRRH (SEQ ID NO: 306), LSPRHH (SEQ ID NO: 307), LSPRRR (SEQ ID NO: 308), LSPHHH (SEQ ID NO: 309) LSPKKK (SEQ ID NO: 310), WLSPRKH (SEQ ID NO: 311), WLSPRKK (SEQ ID NO: 312), WLSPRKR (SEQ ID NO: 313), WLSPKKH (SEQ ID NO: 314), WLSPHKH (SEQ ID NO: 315), WLSPRRH (SEQ ID NO: 316), WLSPRHH (SEQ ID NO: 317), WLSPRRR (SEQ ID NO: 318), WLSPHHH (SEQ ID NO: 319) WLSPKKK (SEQ ID NO: 320). Estes polipéptidos Sp35 incluem a "volta RKH" básica (aminoácidos arginina-lisina-histidina 456-458) no domínio Ig de Sp35. Péptidos Sp35 adicionais que incluem tripéptido básico são ITPKRR (SEQ ID NO: 321), ACHHK (SEQ ID NO: 322) e VCHHK (SEQ ID NO: 323).

Fragmentos de péptidos Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente de, ou consistindo de péptidos do domínio Ig de Sp35 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos. Especificamente, os péptidos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consistem nas seguintes sequências polipeptídicas: X₄X₅RKH (SEQ ID NO: 324), X₄X₅RRR (SEQ ID NO: 325), X₄X₅KKK (SEQ ID NO: 326), X₄X₅HHH (SEQ ID NO: 327), X₄X₅RKK (SEQ ID NO: 328), X₄X₅RKR (SEQ ID NO: 329),

X₄X₅KKH (SEQ ID NO: 330), X₄X₅HKH (SEQ ID NO: 331), X₄X₅RRH (SEQ ID NO: 332) e X₄X₅RHH (SEQ ID NO: 333) em que X₄ é qualquer aminoácido e X₅ é qualquer aminoácido.

Noutros exemplos fragmentos peptídicos Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em péptidos da domínio Ig de Sp35 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos. Especificamente, polipéptidos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consistem nas seguintes sequências polipeptídicas: ITX₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 334), ACX₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 335), VCX₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 336) e SPX₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 337) onde X₆ é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina, X₇ é qualquer aminoácido e X₈ é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina. Por exemplo, um polipéptido que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste na seguinte sequência de polipéptido: SPRLH (SEQ ID NO: 338).

Fragmentos peptídicos Sp35 aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente invenção se ligam incluem, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste em péptidos que contêm aminoácidos 452 -458 no domínio Ig de Sp35, ou os seus derivados, em que o aminoácido 452 é um resíduo de triptofano ou fenilalanina.

Fragmentos de péptidos Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação se ligam incluem, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente de, ou consistindo nos péptidos do domínio

básico de Sp35. Especificamente, os péptidos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consistem nas seguintes sequências polipeptídicas: RRARIRDRK (SEQ ID NO: 339), KKVKEKEK (SEQ ID NO: 340), RRLRLDRK (SEQ ID NO: 341), RRGGRDRK (SEQ ID NO: 342) e RRIRARDRK (SEQ ID NO: 343).

Exemplares adicionais de polipéptidos Sp35 solúveis e de métodos e materiais para a obtenção dessas moléculas para a produção de anticorpos ou fragmentos de anticorpos da presente divulgação podem ser encontrados, por exemplo, no Pedido PCT WO 2004/085648.

Os métodos de preparação de anticorpos são bem conhecidos na técnica e são aqui descritos. Uma vez produzidos anticorpos para vários fragmentos de, ou para o Sp35 de comprimento total sem a sequência de sinal, a determinação de quais os aminoácidos, ou epitopo, de Sp35 ao qual se liga o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio pode ser determinado por protocolos de mapeamento de epitopo tal como aqui descrito, bem como por métodos conhecidos na técnica (por exemplo, ELISA com sanduíche de dois anticorpos, como descrito no "Capítulo 11 - Immunology", *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel et al., v.2, John Wiley & Sons, Inc. (1996)). Protocolos adicionais de mapeamento de epitopos podem ser encontrados em Morris, G. *Epitope Mapping Protocols*, New Jersey: Humana Press (1996). O mapeamento de epitopos também pode ser realizado por meios disponíveis comercialmente (isto é, ProtoPROBE, Inc. (Milwaukee, Wisconsin)).

Além disso, anticorpos produzidos que se ligam-se a qualquer porção do SP35 podem então ser pesquisados relativamente à sua capacidade para actuar como um antagonista de Sp35 e portanto promover o crescimento de neurites, a sobrevivência

neuronal e de oligodendrócitos, a proliferação e diferenciação bem como para promover a mielinização. Os anticorpos podem ser rastreados para a sobrevivência de oligodendrócitos/neuronal usando o método tal como descrito nos Exemplos 10 e 11. Além disso, os anticorpos podem ser rastreados quanto à sua capacidade para promover a mielinização usando o método do Exemplo 9. Finalmente, os anticorpos podem ser rastreados quanto à sua capacidade para promover a proliferação de oligodendrócitos e a diferenciação, bem como o crescimento de neurites, utilizando o método descrito no Exemplo 7. Outras funções antagonistas de anticorpos da presente divulgação pode ser testadas utilizando outros ensaios tal como descrito nos Exemplos aqui apresentados.

Noutros exemplos, a presente divulgação inclui um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, que se liga especificamente ou preferencialmente a pelo menos um epitopo de SP35, quando o epitopo compreende, consiste essencialmente em, ou é constituído por, pelo menos, cerca de quatro a cinco aminoácidos de SEQ ID NO: 2, pelo menos sete, pelo menos, nove, ou entre, pelo menos, cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Os aminoácidos de um dado epitopo de SEQ ID NO: 2 tais como descritos podem ser, mas não precisam de ser contíguos ou lineares. Em certos exemplos, o pelo menos um epitopo de Sp35 compreende, consiste essencialmente de, ou consiste num epitopo não linear formado pelo domínio extracelular de Sp35, tal como expresso na superfície de uma célula ou na forma de um fragmento solúvel, por exemplo, fundido com uma região Fc de IgG. Assim, em certos exemplos, o pelo menos um epitopo de Sp35 compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo

menos 20, pelo menos 25, entre cerca de 15 e cerca de 30, ou pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 aminoácidos contíguos ou não contíguos de SEQ ID NO: 2, onde os aminoácidos não-contíguos formam um epítipo através do enrolamento de proteínas.

Noutros exemplos, a presente divulgação inclui um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado, que se liga especificamente ou preferencialmente a pelo menos um epítipo de SP35, quando o epítipo compreende, consiste essencialmente em, ou é constituído por, além de um, dois, três, quatro, cinco, seis ou mais aminoácidos contíguos ou não contíguos da SEQ ID NO: 2, tal como descrito acima, e uma porção adicional que modifica a proteína, por exemplo, uma unidade de hidrato de carbono pode ser incluída de modo que o anticorpo Sp35 se ligue com maior afinidade à proteína alvo modificado do que uma versão não modificada da proteína. Alternativamente, o anticorpo SP35 não se liga de todo à versão não modificada da proteína alvo.

Em certos exemplos, a presente divulgação dirige-se a um anticorpo, ou seu fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado, que se liga especificamente a um polipéptido Sp35 ou seu fragmento, ou a um polipéptido variante Sp35, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (K_D), que é menor do que a K_D para o referido anticorpo monoclonal de referência.

Em certos exemplos, um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado da divulgação liga-se especificamente a pelo menos um epítipo de Sp35, ou fragmento ou variante acima descrito, ou seja, liga-se a um tal epítipo mais rapidamente do que se ligaria a um epítipo não relacionado, ou a um epítipo aleatório; liga-se

preferencialmente a pelo menos um epitopo de Sp35, ou fragmento ou variante acima descrito, ou seja, liga-se a um tal epitopo mais facilmente do que se ligaria a uma epitopo relacionado, semelhante, homólogo ou análogo; inibe competitivamente a ligação de um anticorpo de referência que por si se liga especificamente ou preferencialmente a um determinado epitopo de Sp35 ou um fragmento ou variante acima descrita; ou se liga a pelo menos um epitopo de Sp35 ou um fragmento ou variante acima descrita com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação K_D de menos do que cerca de 5×10^{-2} M, cerca de 10^{-2} M, cerca de 5×10^{-3} M, cerca de 10^{-3} M, cerca de 5×10^{-4} M, cerca de 10^{-4} M, cerca de 5×10^{-5} M, cerca de 10^{-5} M, cerca de 5×10^{-6} M, cerca de 10^{-6} M, cerca de 5×10^{-7} M, cerca de 10^{-7} M, cerca de 5×10^{-8} M, cerca de 10^{-8} M, cerca de 5×10^{-9} M, cerca de 10^{-9} M, cerca de 5×10^{-10} M, cerca de 10^{-10} M, cerca de 5×10^{-11} M, cerca de 10^{-11} M, cerca de 5×10^{-12} M, cerca de 10^{-12} M, cerca de 5×10^{-13} M, cerca de 10^{-13} M, cerca de 5×10^{-14} M, cerca de 10^{-14} M, cerca de 5×10^{-15} M, ou cerca de 10^{-15} M. Num exemplo particular, o anticorpo ou um seu fragmento liga-se preferencialmente a um polipéptido Sp35 humano ou a um seu fragmento, em relação a um polipéptido SP35 murino ou a um seu fragmento.

Tal como utilizado no contexto de constantes de dissociação da ligação de anticorpos, o termo "cerca de" permite o grau de variação inerente aos métodos utilizados para medir a afinidade de anticorpos. Por exemplo, dependendo do grau de precisão dos instrumentos utilizados, do erro padrão com base no número de amostras medidas, e do erro de arredondamento, o termo "cerca de 10^{-2} M" pode incluir, por exemplo, a partir de 0,05 M até 0,005 M.

Em exemplos específicos, um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado da divulgação liga-se aos polipéptidos Sp35 ou seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de dissociação ($k(\text{dissociação})$) inferior ou igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-3} s^{-1} . Alternativamente, um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado da divulgação liga-se a polipéptidos SP35 ou seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de dissociação ($k(\text{dissociação})$) inferior ou igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ou 10^{-5} s^{-1} $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-7} s^{-1} .

Noutros exemplos, um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado da divulgação liga-se a polipéptidos Sp35 ou seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de associação ($k(\text{associação})$) superior ou igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Alternativamente, um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado da divulgação liga-se a polipéptidos Sp35 ou seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de associação ($k(\text{associação})$) superior ou igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Em vários exemplos, um anticorpo, ou SP35 seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, como aqui descrito é um antagonista da actividade de Sp35. Em certos exemplos, por exemplo, a ligação de um anticorpo antagonista de SP35 a SP35, como expresso em neurónios, bloqueia a inibição do crescimento das neurites associada à mielina ou a morte celular neuronal. Noutros exemplos, a ligação do anticorpo Sp35 a Sp35, como expresso em oligodendrócitos, bloqueia a inibição do crescimento ou diferenciação de

oligodendrócitos, ou bloqueia a desmielinização ou dismielinização de neurónios do SNC.

A menos que seja especificamente indicado, como aqui utilizado, um "seu fragmento", em referência a um anticorpo refere-se a um fragmento de ligação ao antigénio, isto é, a uma porção do anticorpo que se liga especificamente ao antigénio. Num exemplo, um anticorpo Sp35, por exemplo, um anticorpo da divulgação é um anticorpo Sp35 bi-específico, polipéptido que se liga, ou anticorpo, por exemplo, um anticorpo bi-específico, "minibody", anticorpo com domínio suprimido, ou uma proteína de fusão possuindo especificidade de ligação para mais do que um epitopo, por exemplo, mais do que um antigénio ou mais de um epitopo no mesmo antigénio. Num exemplo, um anticorpo bi-específico Sp35, polipéptido que se liga, ou anticorpo tem pelo menos um domínio de ligação específico para pelo menos um epitopo de um polipéptido alvo aqui descrito, por exemplo, Sp35. Noutro exemplo, um anticorpo bi-específico Sp35, polipéptido de ligação, ou anticorpo tem pelo menos um domínio de ligação específico para um epitopo num polipéptido alvo e pelo menos um domínio de ligação ao alvo específico para um fármaco ou toxina. Ainda noutro exemplo, um anticorpo bi-específico SP35, polipéptido de ligação, ou anticorpo tem pelo menos um domínio de ligação específico para um epitopo num polipéptido alvo aqui divulgado, e pelo menos um domínio de ligação específico para um profármaco. Um anticorpo bi-específico Sp35, polipéptido de ligação, ou anticorpo pode ser um anticorpo tetravalente que tem dois domínios de ligação ao alvo específicos para um epitopo de um polipéptido alvo aqui divulgado e dois domínios de ligação ao alvo específicos para um segundo alvo. Assim, um anticorpo bi-específico tetravalente Sp35, polipéptido de ligação, ou anticorpo podem ser bivalentes para cada especificidade.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou seus derivados da divulgação, tal como é conhecido pelos especialistas na matéria, pode compreender uma região constante que medeia uma ou mais funções efectoras. Por exemplo, a ligação do componente de complemento C1 para uma região constante de anticorpo pode activar o sistema do complemento. A activação do complemento é importante na opsonização e lise de patogénios para as células. A activação do complemento também estimula a resposta inflamatória e pode também estar envolvida na hipersensibilidade autoimune. Além disso, os anticorpos ligam-se aos receptores das várias células através da região Fc, com um local de ligação ao receptor de Fc na região Fc do anticorpo que se liga a um receptor de Fc (FcR) numa célula. Existem vários receptores Fc que são específicos para diferentes classes de anticorpos, incluindo IgG (receptores gama), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). A ligação do anticorpo a receptores Fc às superfícies celulares desencadeia um número de reacções biológicas importantes e diversas, incluindo absorção e destruição de partículas revestidas pelo anticorpo, a eliminação de complexos imunes, a lise de células alvo revestidas com anticorpo por células assassinas (denominada citotoxicidade mediada por células dependente do anticorpo, ou ADCC), a liberação de mediadores inflamatórios, transferência placentária e controlo da produção de imunoglobulina.

Por conseguinte, certos exemplos da divulgação incluem um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, em que pelo menos uma fracção de um ou mais dos domínios da região constante foi eliminado ou de outro modo alterado de modo a proporcionar características bioquímicas desejadas como funções efectoras reduzidas, a

capacidade de dimerizar não-covalentemente, maior capacidade de se localizar no local de um tumor, reduzida meia-vida no soro, ou aumento da meia-vida no soro, quando comparados com um anticorpo completo, inalterado de aproximadamente a mesma imunogenicidade. Por exemplo, certos anticorpos para utilização nos métodos de diagnóstico e de tratamento aqui descritos são anticorpos com deleção de domínio que compreendem uma cadeia de polipéptido semelhante a uma cadeia pesada de imunoglobulina, mas que não têm pelo menos uma porção de um ou mais domínios de cadeia pesada. Por exemplo, em certos anticorpos, um domínio completo da região constante do anticorpo modificado será eliminado, por exemplo, a totalidade ou parte do domínio C_H2 será deletado.

Em certos anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou seus derivados aqui descritos, a parte Fc pode ser mutada para reduzir a função efectora utilizando técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, a deleção ou inactivação (através de mutações pontuais ou por outros meios) de um domínio da região constante pode reduzir a ligação ao receptor Fc do anticorpo modificado em circulação, aumentando assim a localização do tumor. Noutros casos, pode ser que as alterações da região constante de acordo com a divulgação moderem a ligação do complemento e, assim, reduzam a meia-vida no soro e a associação não específica de uma citotoxina conjugada. Ainda outras modificações da região constante podem ser usadas para modificar as ligações dissulfureto ou porções de oligossacáridos que permitem um aumento da localização devido ao aumento da especificidade do antígeno ou da flexibilidade do anticorpo. O perfil fisiológico resultante, biodisponibilidade e outros efeitos bioquímicos das modificações, tais como a localização tumoral, biodistribuição e meia-vida no soro, pode ser facilmente

medido e quantificado utilizando técnicas imunológicas bem conhecidas, sem experimentação indevida.

Formas modificadas de anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da divulgação podem ser preparadas a partir do precursor completo ou de anticorpos parentes utilizando técnicas conhecidas na técnica. Exemplos de técnicas são aqui discutidos em maior pormenor.

Em certos exemplos, tanto as regiões variáveis e como as constantes de anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados são inteiramente humanos. Os anticorpos totalmente humanos podem ser preparados usando técnicas que são conhecidas na técnica e tal como aqui descrito. Por exemplo, os anticorpos totalmente humanos contra um antigénio específico, podem ser preparados pela administração do antigénio a um animal transgénico, que foi modificado para produzir tais anticorpos em resposta ao estímulo antigénico, mas cujos loci endógenos foram desactivados. Exemplos de técnicas que podem ser usadas para preparar tais anticorpos estão descritos nas Patentes dos E.U.A.: 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140. Outras técnicas são conhecidas na técnica. Os anticorpos totalmente humanos podem igualmente ser produzidos por diversas tecnologias de apresentação, por exemplo, de apresentação de fagos ou de outros sistemas de apresentação virais, como descrito em mais detalhe aqui noutro local.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da divulgação podem ser preparados ou fabricados utilizando técnicas que são conhecidas na técnica. Em certos exemplos, as moléculas de anticorpo ou seus fragmentos são "produzidos de forma recombinante", isto é,

são produzidos utilizando tecnologia de ADN recombinante. Exemplos de técnicas para fabricar moléculas de anticorpo ou seus fragmentos são discutidas em mais detalhe neste documento.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação também inclui os derivados que são modificados, por exemplo, através da ligação covalente de qualquer tipo de molécula de anticorpo de tal modo que a ligação covalente não impede o anticorpo de se ligar especificamente ao seu epitopo cognato. Por exemplo, mas não como limitação, os derivados do anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, por exemplo, por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos protectores/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc. Qualquer das numerosas modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não se limitando a clivagem química específica, acetilação, formilação, a síntese metabólica de tunicamicina, etc. Além disso, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

Em certos exemplos, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação não irão induzir uma resposta imunitária prejudicial no animal a ser tratado, por exemplo, num ser humano. Num exemplo, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da divulgação são modificados para reduzir a sua imunogenicidade, utilizando técnicas reconhecidas na técnica. Por exemplo, os anticorpos podem ser humanizados, primatizados, des-imunizados, ou podem ser preparados anticorpos quiméricos. Estes tipos de anticorpos são derivados de um anticorpo não

humano, tipicamente um anticorpo de murino ou primata, que retém ou retém substancialmente as propriedades de ligação ao antigénio do anticorpo progenitor, mas que é menos imunogénico em humanos. Isto pode ser conseguido por vários métodos, incluindo: (a) enxerto dos domínios variáveis não-humanos completos nas regiões constantes humanas para gerar anticorpos quiméricos, (b) enxerto de pelo menos uma parte de uma ou mais regiões determinantes de complementaridade não humanas (CDRs) numa estrutura humana e regiões constantes, com ou sem retenção de resíduos críticos estruturais, ou (c) transplante da totalidade dos domínios variáveis não humanos, mas “encobri-los” com uma secção de tipo humano através da substituição de resíduos de superfície. Tais métodos são descritos em Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6851-6855 (1984); Morrison *et al.*, *Adv. Immunol.* 44: 65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28: 489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31: 169-217 (1994), e Pat. E.U.A. Nos. 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, e 6,190,370.

A des-imunização pode também ser usada para diminuir a imunogenicidade de um anticorpo. Tal como aqui utilizado, o termo “des-imunização” inclui a alteração de um anticorpo para modificar os epitopos de células T (ver, por exemplo, W09852976A1, W00034317A2). Por exemplo, as sequências V_H e V_L do anticorpo de partida são analisadas e um epítipo de célula T humana “mapeia” de cada região V mostrando a localização de epitopos em relação às regiões determinantes de complementaridade (CDRs) e outros resíduos chave no interior da sequência. Epitopos individuais das células T a partir do mapa de epitopos de célula T são analisados de modo a identificar substituições de aminoácidos alternativos, com um baixo risco de alteração da actividade do anticorpo final. Uma série de sequências alternativas de V_H e V_L são desenhadas

compreendendo combinações de substituições de aminoácidos e estas sequências são subsequentemente incorporadas numa gama de polipéptidos de ligação, por exemplo, anticorpos específicos para Sp35 ou seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos de diagnóstico e de tratamento aqui descritos, que são então testados relativamente à função. Normalmente, são gerados e testados entre 12 e 24 anticorpos variantes. Os genes completos de cadeia pesada e leve que compreendendo as regiões V modificada e C humana são então clonados em vectores de expressão e os plasmídeos subsequentes introduzidos em linhas celulares para a produção do anticorpo completo. Os anticorpos são então comparados em ensaios bioquímicos e biológicos adequados, e a variante óptima é identificada.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da divulgação podem ser gerados por qualquer método adequado conhecido na técnica. Anticorpos policlonais contra um antigénio de interesse podem ser produzidos por vários processos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um anticorpo Sp35, por exemplo, um polipéptido de ligação, por exemplo, um anticorpo específico para Sp35 ou um seu fragmento imuno-específico pode ser administrado a vários animais hospedeiros, incluindo, mas não limitados a, coelhos, ratinhos, ratos, galinhas, hamsters, cabras, burros, etc., para induzir a produção de soros contendo anticorpos policlonais específicos para o antigénio. Vários adjuvantes podem ser utilizados para aumentar a resposta imunológica, dependendo das espécies hospedeiras, e incluem, mas não estão limitados a, Freund (completo e incompleto), géis minerais tais como hidróxido de alumínio, substâncias activas de superfície tais como lisolecitina, polióis plurónicos, polianiões, péptidos, emulsões oleosas, hemocianinas da lapa gigante, dinitrofenol e adjuvantes humanos potencialmente

úteis tais como BCG (bacilo Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Esses adjuvantes são também bem conhecidos na técnica.

Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo o uso de tecnologias de hibridoma, recombinante, e de apresentação de fagos, ou uma combinação destas. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando técnicas de hibridoma incluindo aquelas conhecidas na técnica e ensinadas, por exemplo, em: Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, Nova Iorque, 563-681 (1981). O termo "anticorpo monoclonal", tal como aqui usado não se limita a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que é derivado a partir de um único clone, incluindo qualquer clone eucariota, procariota, ou de fago, e não o método pelo qual foi produzido. Assim, o termo "anticorpo monoclonal", não se limita a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando ratinhos "knockout" Sp35 para aumentar as regiões de reconhecimento do epítipo. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo a utilização de tecnologia de hibridoma, recombinante e de apresentação de fagos, tal como aqui descrito noutra local.

Utilizando protocolos reconhecidos na técnica, num exemplo, os anticorpos são estimulados em mamíferos através de múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais do antigénio relevante (por exemplo, antigénios associados a tumores purificado, tais como Sp35 ou células ou extractos

celulares que compreendem tais antigénios) e um adjuvante. Esta imunização tipicamente provoca uma resposta imune que compreende a produção de anticorpos reactivos para o antigénio de esplenócitos ou linfócitos activados. Enquanto os anticorpos resultantes podem ser recolhidos do soro do animal para proporcionar preparações policlonais, é muitas vezes desejável isolar linfócitos individuais do baço, nódulos linfáticos ou do sangue periférico para proporcionar preparações homogéneas de anticorpos monoclonais (MAbs). Preferencialmente, os linfócitos são obtidos a partir do baço.

Neste processo bem conhecido (Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975)), os linfócitos de vida relativamente curta, ou mortais, de um mamífero que tenha sido injectado com antigénio são fundidos com uma linha celular tumoral imortal (por exemplo, uma linha celular de mieloma), assim, a produção de células híbridas ou “hibridomas”, que são ambos imortais e capazes de produzir o anticorpo codificado geneticamente da célula B. Os híbridos resultantes são segregados em estirpes genéticas simples por selecção, diluição e novo crescimento com cada uma das estirpes individuais compreendendo genes específicos para a formação de um único anticorpo. Produzem anticorpos que são homogéneos contra um antigénio desejado e, em referência à sua ascendência genética pura, são chamados de “monoclonal”.

As células de hibridoma assim preparadas são inoculadas e crescidas num meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Os peritos na técnica apreciarão que os reagentes, as linhas celulares e os meios para a formação, a selecção e o crescimento de hibridomas estão disponíveis comercialmente a

partir de um número de fontes e protocolos padronizados estão bem estabelecidos. Geralmente, o meio de cultura no qual as células de hibridoma estão a crescer é ensaiado relativamente à produção de anticorpos monoclonais contra o antigénio desejado. De preferência, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por ensaios *in vitro*, tais como a imunoprecipitação, o radioimunoensaio (RIA) ou ensaio de imunossorção associado a enzima (ELISA). Depois de identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou actividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e crescidos por métodos convencionais (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp 59-103 (1986)). Será ainda apreciado que os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones podem ser separados do meio de cultura, fluido de ascites ou soro por procedimentos convencionais de purificação, tais como, por exemplo, a proteína A, cromatografia de hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Fragmentos de anticorpos que reconhecem epitopos específicos podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, fragmentos de Fab e $F(ab')_2$ podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, utilizando enzimas tais como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos $F(ab')_2$). Os fragmentos $F(ab')_2$ contêm a região variável, região constante da cadeia leve e do domínio C_{H1} da cadeia pesada.

Os especialistas na técnica também apreciarão que os ADN que codificam para anticorpos ou fragmentos de anticorpos (por exemplo, locais de ligação ao antigénio) podem também ser derivados de bibliotecas de anticorpos, tais como bibliotecas

de apresentação de fagos. Em particular, tal fago pode ser utilizado para visualizar os domínios de ligação ao antígeno, expressos a partir de um repertório ou uma biblioteca combinatória de anticorpos (por exemplo, humano ou murino). O fago que expressa um domínio de ligação ao antígeno que se liga ao antígeno de interesse pode ser seleccionado ou identificado com antígeno, por exemplo, utilizando o antígeno ou antígeno marcado ligado ou capturado numa superfície sólida ou esfera. Os fagos utilizados nestes métodos são tipicamente fagos filamentosos incluindo domínios de ligação fd e M13 expressos do fago com Fab, Fv OE DAB (região Fv individual de cadeias leves ou pesadas) ou domínios anticorpo de anticorpo Fv estabilizados com dissulfureto fundidos com ou a proteína do gene III ou do gene VIII do fago. Exemplos de métodos estão apresentados, por exemplo, na EP 368 684 B1; Patente E.U.A. 5,969,108, Hoogenboom, HR e Chames, *Immunol. Today* 21: 371 (2000); Nagy et al. *Nat. Med.* 8: 801 (2002); Huie et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 2682 (2001); Lui et al., *J. Mol Biol.*, 315: 1063 (2002). Várias publicações (por exemplo, Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)) descreveram a produção de anticorpos humanos de elevada afinidade por recombinação homóloga na cadeia, assim como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como estratégia para a construção de grandes bibliotecas de fagos. Noutro exemplo, pode-se usar uma apresentação ribossomal para substituir o bacteriófago como plataforma de apresentação (ver, por exemplo, Hanes et al., *Nat. Biotechnol.* 18: 1287 (2000); Wilson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3750 (2001); ou Irving et al., *J. Immunol. Methods* 248: 31 (2001)). Ainda noutro exemplo, bibliotecas de superfície celular podem ser rastreados para anticorpos (Boder et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10701 (2000); Daugherty et al., *J. Immunol. Methods* 243: 211 (2000)). Tais procedimentos proporcionam alternativas às

técnicas tradicionais de hibridoma para o isolamento e clonagem subsequente de anticorpos monoclonais.

Em métodos de apresentação de fagos, os domínios de anticorpo funcionais são apresentados à superfície de partículas de fago que transportam as sequências de polinucleótidos que os codificam. Por exemplo, as sequências de ADN que codificam para as regiões V_H e V_L são amplificadas a partir de bibliotecas de cADN de origem animal (por exemplo, bibliotecas de cADN humano ou murino de tecidos linfóides) ou bibliotecas de cADN sintético. Em certos exemplos, os ADN que codificam para regiões V_H e V_L estão ligados um ao outro por um ligante scFv por PCR e clonados num vector de fagemídeo (por exemplo, pCANTAB 6 ou pComb 3 HSS). O vector é electroporado em *E. coli* e a *E. coli* é infectada com o fago auxiliar. Os fagos utilizados nestes métodos são tipicamente fagos filamentosos incluindo fd e M13 e as regiões V_H ou V_L são normalmente fundidas de forma recombinante, quer ao gene III ou ao gene VIII do fago. O fago que expressa um domínio de ligação ao antigénio que se liga a um antigénio de interesse (ou seja, um polipéptido Sp35 ou um seu fragmento) pode ser seleccionado ou identificado com o antigénio, por exemplo, utilizando o antigénio marcado ou o antigénio ligado ou capturado numa superfície sólida ou esfera.

Exemplos adicionais de métodos de apresentação de fagos que podem ser usados para preparar os anticorpos incluem aqueles divulgados em Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187: 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994); as publicações WO 1992/001047 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; e Pat.

E.U.A. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 e 5,969,108.

Tal como descrito nas referências acima, após a selecção de fagos, as regiões que codificam para o anticorpo do fago podem ser isoladas e utilizadas para gerar anticorpos completos, incluindo anticorpos humanos, ou qualquer outro fragmento de ligação ao antigénio desejado, e expressas em qualquer hospedeiro desejado, incluindo células de mamífero, células de insecto, células de planta, leveduras e bactérias. Por exemplo, as técnicas para produzir de modo recombinante fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂ podem também ser empregues utilizando modos conhecidos na técnica, tais como os divulgados na publicação PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6): 864-869 (1992); e Sawai et al., *AJRI* 34: 26-34 (1995); e Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988).

Exemplos de técnicas que podem ser utilizadas para produzir Fvs de cadeia simples e anticorpos incluem aquelas descritas nas Patentes E.U.A. Nos. 4,946,778 e 5,258,498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90: 7995-7999 (1993); e Skerra et al., *Science* 240: 1038-1040 (1988). Para algumas utilizações, incluindo a utilização *in vivo* de anticorpos em seres humanos e em ensaios de detecção *in vitro*, pode ser preferível utilizar anticorpos quiméricos, humanizados ou humanos. Um anticorpo quimérico é uma molécula na qual diferentes porções do anticorpo são derivadas de diferentes espécies animais, tais como anticorpos que possuem uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal murino e uma região constante de imunoglobulina humana. Os métodos para produzir os anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); Oi et al., *BioTechniques*

4: 214 (1986); Gillies et al., *J. Immunol. Methods* 125: 191-202 (1989); Pat. E.U.A. Nos. 5,807,715; 4,816,567; e 4,816,397. Os anticorpos humanizados são moléculas de anticorpo derivadas de um anticorpo de espécie não humana que se ligam ao antígeno desejado possuindo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da espécie não humana e regiões estruturais de uma molécula de imunoglobulina humana. Muitas vezes, os resíduos estruturais das regiões estruturais humanas serão substituídos pelo resíduo correspondente do anticorpo dador de CDR para alterar, preferencialmente melhorar, a ligação ao antígeno. Estas substituições estruturais são identificadas por métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, através de modelação das interacções entre a CDR e resíduos estruturais para identificar os resíduos importantes estruturais para a ligação ao antígeno e pela comparação de sequências para identificar os resíduos estruturais incomuns em posições particulares. (Ver, por exemplo, Queen et al., Pat. E.U.A. No. 5,585,089; Riechmann et al., *Nature* 332: 323 (1988)). Anticorpos podem ser humanizados usando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo, por exemplo, enxerto de CDR (EP 239,400; publicação PCT WO 91/09967; Pats. E.U.A. Nos. 5,225,539; 5,530,101; e 5,585,089), revestimentos ou alterações à superfície (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6): 805-814 (1994); Roguska. et al., *PNAS* 91: 969-973 (1994)), e recombinação homóloga na cadeia (Pat. E.U.A. No. 5,565,332).

Os anticorpos completamente humanos são particularmente desejáveis para o tratamento terapêutico de pacientes humanos. Os anticorpos humanos podem ser preparados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, incluindo métodos de apresentação de fagos descritas acima utilizando

bibliotecas de anticorpos derivados a partir de sequências de imunoglobulina humana. Ver também, Patentes dos EUA. Nos. 4,444,887 e 4,716,111; e publicações PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, e WO 91/10741.

Os anticorpos humanos também podem ser produzidos utilizando ratinhos transgênicos que são incapazes de expressar imunoglobulinas endógenas funcionais, mas que podem expressar genes de imunoglobulina humana. Por exemplo, os complexos de genes de imunoglobulina humana de cadeia pesada e leve podem ser introduzidos aleatoriamente ou por recombinação homóloga em células estaminais embrionárias de ratinho. Em alternativa, a região variável humana, a região constante e a região de diversidade podem ser introduzidas em células estaminais embrionárias de ratinho, para além dos genes de cadeia pesada e leve humanas. Os genes das cadeia pesada e leve da imunoglobulina de ratinho podem ser tornados não funcionais separadamente ou simultaneamente com a introdução de loci de imunoglobulina humana, por recombinação homóloga. Em particular, a deleção homozigótica da região JH impede a produção de anticorpos endógenos. As células estaminais embrionárias modificadas são expandidas e microinjectadas em blastocistos para produzir ratinhos quiméricos. Os ratinhos quiméricos são então criados para produzir uma prole homozigótica que expressa anticorpos humanos. Os ratinhos transgênicos são imunizados da forma normal com um antígeno selecionado, por exemplo, a totalidade ou uma parte de um polipéptido alvo desejado. Os anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno podem ser obtidos a partir dos ratinhos transgênicos imunizados, utilizando tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes de imunoglobulina humana nos ratinhos transgênicos rearranjam-se durante a diferenciação de células-B, e subsequentemente sofrem troca

de classe e de mutação somática. Assim, utilizando uma tal técnica, é possível produzir anticorpos IgG, IgA, IgM e IgE terapeuticamente úteis. Para uma visão geral desta tecnologia para a produção de anticorpos humanos, ver Lonberg e Huszar *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995). Para uma discussão detalhada desta tecnologia para produzir anticorpos humanos e anticorpos monoclonais humanos e protocolos para produzir tais anticorpos, ver, por exemplo, as publicações PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; Patente dos E.U.A. Nos. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; e 5,939,598. Além disso, empresas como a Abgenix, Inc. (Freemont, CA) e Genpharm (San José, CA) pode ser envolvidas para proporcionar anticorpos humanos dirigidos contra um antigénio seleccionado utilizando tecnologia semelhante à descrita acima.

Os anticorpos completamente humanos que reconhecem um epitopo seleccionado podem ser gerados utilizando uma técnica conhecida como "selecção guiada". Nesta abordagem um anticorpo monoclonal não humano seleccionado, por exemplo, um anticorpo de rato, é utilizado para orientar a selecção de um anticorpo completamente humano reconhecendo o mesmo epitopo. (Jespers *et al.*, *Bio/Technology* 12: 899-903 (1988). Ver também, Patente E.U.A. No. 5,565,332).

Além disso, os anticorpos dirigidos para os polipéptidos alvo da divulgação podem, por sua vez, ser utilizados para gerar anticorpos anti-idiotipo que "mimetizam" polipéptidos alvo utilizando técnicas bem conhecidas dos peritos na técnica. (Ver, por exemplo, Greenspan e Bona, *FASEB J.* 7(5): 437-444 (1989) e Nissinoff, *J. Immunol.* 147(8): 2429-2438 (1991)). Por exemplo, os anticorpos que se ligam a e inibem competitivamente a formação de multímeros do polipéptido e/ou a ligação de um polipéptido da divulgação a um ligando pode

ser utilizada para gerar anti-idiotipos que “mimetizam” a formação de multímeros do polipéptido e/ou do domínio de ligação e, por consequência, ligar-se ao e neutralizar o polipéptido e/ou o seu ligando. Tais fragmentos neutralizantes anti-idiotipos ou Fab de tais anti-idiotipos podem ser utilizados em regimes terapêuticos para neutralizar o ligando polipeptídico. Por exemplo, tais anticorpos anti-idiotípicos podem ser utilizados para ligar um polipéptido alvo desejado e/ou para se ligar os seus ligandos/receptores e assim bloquear a sua actividade biológica.

o ADN que codifica para os anticorpos monoclonais desejados pode ser facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, utilizando de sondas de oligonucleótidos que são capazes de se ligarem especificamente a genes que codificam para as cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma isoladas e subclonadas servem como uma fonte preferida de tal ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que de outro modo não produzem imunoglobulinas. Mais particularmente, o ADN isolado (que pode ser sintético, tal como aqui descrito) pode ser utilizado para clonar as sequências de regiões constantes e variável para o fabrico de anticorpos, tal como descrito em Newman *et al.*, Patente dos E.U.A. No. 5,658,570, depositada em 25 de Janeiro de 1995. Essencialmente, isto envolve a extracção de ARN das células seleccionadas, a conversão em cADN e amplificação por PCR utilizando iniciadores específicos para Ig. Iniciadores adequados para este fim estão também descritos na Patente dos E.U.A. No. 5,658,570. Como será discutido em mais detalhe abaixo, as células

transformadas que expressam o anticorpo desejado podem ser crescidas em quantidades relativamente grandes para proporcionar fontes clínicas e comerciais da imunoglobulina.

Num exemplo, um anticorpo Sp35 da divulgação compreende pelo menos uma cadeia pesada ou leve CDR de uma molécula de anticorpo. Noutro exemplo, um anticorpo Sp35 da divulgação compreende pelo menos duas CDRs de uma ou mais moléculas de anticorpo. Noutro exemplo, um anticorpo Sp35 da divulgação compreende, pelo menos, três CDR de uma ou mais moléculas de anticorpo. Noutro exemplo, um anticorpo SP35 da divulgação compreende pelo menos quatro CDRs de uma ou mais moléculas de anticorpo. Noutro exemplo, um anticorpo SP35 da divulgação compreende, pelo menos, cinco CDRs de uma ou mais moléculas de anticorpo. Noutro exemplo, um anticorpo SP35 da divulgação compreende, pelo menos, seis CDR de uma ou mais moléculas de anticorpo. Exemplos de moléculas de anticorpo que compreendem pelo menos uma CDR que podem ser incluídos nos anticorpos Sp35 em questão são descritas aqui.

Num exemplo específico, a sequência de aminoácidos dos domínios variáveis de cadeia pesada e/ou leve pode ser inspeccionada para identificar as sequências de regiões determinantes de complementaridade (CDRs) através de métodos que são bem conhecidos na técnica, por exemplo, através da comparação com sequências de aminoácidos conhecidas de outras regiões variáveis da cadeia pesada e leve para determinar as regiões de hipervariabilidade de sequência. Usando técnicas de ADN recombinante de rotina, uma ou mais das CDRs podem ser inseridos dentro de regiões estruturais, por exemplo, em regiões estruturais humanas para humanizar um anticorpo não-humano. As regiões estruturais podem ser de ocorrência natural ou regiões estruturais de consenso e, de preferência, regiões estruturais humanas (ver, por exemplo, Chothia et

al., *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998) para uma lista de regiões estruturais humanas). De preferência, o polinucleótido gerado pela combinação das regiões estruturais e CDRs codifica para um anticorpo que se liga especificamente a, pelo menos, um epítipo de um polipéptido desejado, por exemplo, Sp35. De preferência, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser feitas dentro das regiões estruturais, e, de preferência, as substituições de aminoácidos melhoram a ligação do anticorpo ao seu antigénio. Além disso, tais métodos podem ser usados para fazer as substituições ou deleções de aminoácidos de um ou mais resíduos de cisteína da região variável que participam numa ligação dissulfureto intra-cadeia para gerar moléculas de anticorpo que carecem de uma ou mais ligações dissulfureto intra-cadeia. Outras alterações no polinucleótido são englobadas pela divulgação e estão no âmbito da perícia na técnica.

Além disso, as técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos" (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 851-855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604-608 (1984); Takeda *et al.*, *Nature* 314: 452-454 (1985)) por "splicing" dos genes de uma molécula de anticorpo de ratinho de especificidade apropriada para o antigénio, em conjunto com genes de uma molécula de anticorpo humano de actividade biológica apropriada podem ser utilizadas. Como aqui utilizado, um anticorpo quimérico é uma molécula na qual porções diferentes são derivadas de diferentes espécies animais, tais como aqueles que têm uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal murino e uma região constante de imunoglobulina humana, por exemplo, anticorpos humanizados.

Alternativamente, as técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (Patente dos E.U.A. No. 4,694,778;

Bird, *Science* 242: 423-442 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988); e Ward et al., *Nature* 334: 544-554 (1989)) podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia simples. Os anticorpos de cadeia simples são formados através da ligação dos fragmentos da região Fv de cadeia pesada e leve através de uma ponte de aminoácidos, resultando num anticorpo de cadeia simples. As técnicas para a montagem de fragmentos Fv funcionais em *E. coli* podem também ser utilizadas (Skerra et al., *Science* 242: 1038-1041 (1988)).

Ainda outros exemplos da presente divulgação compreendem a geração de anticorpos humanos ou substancialmente humanos em animais transgênicos (por exemplo, ratinhos) que são incapazes de produção de imunoglobulina endógena (ver por exemplo, Patente dos E.U.A. Nos. 6,075,181, 5,939,598, 5,591,669 e 5,589,369. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica da região de união da cadeia pesada do anticorpo em ratinhos quiméricos e de mutantes na linha germinal ratinhos resulta na inibição completa da produção de anticorpos endógenos. A transferência de um conjunto de genes de imunoglobulina humana para os ratinhos mutantes na linha germinal humana irá resultar na produção de anticorpos humanos após estímulo com o antigénio. Outro meio preferido para a produção de anticorpos humanos utilizando ratinhos SCID é divulgado na Patente dos E.U.A. No. 5,811,524. Será apreciado que o material genético associado a estes anticorpos humanos podem também ser isolado e manipulado, tal como aqui descrito.

Ainda outro método altamente eficiente para a produção de anticorpos recombinantes é descrito por Newman, *Biotechnology* 10: 1455-1460 (1992). Especificamente, esta técnica resulta na geração de anticorpos primatizados que contêm domínios

variáveis de macaco e sequências humanas constantes. Além disso, esta técnica é também descrita nas Patente dos E.U.A. atribuídas em conjunto Nos. 5,658,570, 5,693,780 e 5,756,096.

Noutro exemplo, os linfócitos podem ser seleccionados por micromanipulação e os genes variáveis isolados. Por exemplo, as células mononucleares do sangue periférico podem ser isoladas a partir de um mamífero imunizado e cultivadas durante cerca de 7 dias *in vitro*. As culturas podem ser rastreadas para IgG específicos que cumpram com os critérios de selecção. As células de poços positivos podem ser isoladas. As células B produtoras de Ig individuais podem ser isoladas por FACS ou através da sua identificação num ensaio de placa hemolítico mediado pelo complemento. As células B produtoras de Ig pode ser micromanipuladas num tubo e os genes V_H e V_L podem ser amplificados utilizando, por exemplo, RT-PCR. Os genes V_H e V_L podem ser clonados num vector de expressão de anticorpos e transfectado para células (por exemplo, células eucarióticas ou procarióticas) para a expressão.

Alternativamente, as linhas celulares produtoras de anticorpos podem ser seleccionadas e cultivadas utilizando técnicas bem conhecidas pelos especialistas na técnica. Tais técnicas são descritas em diversos manuais de laboratório e publicações principais. A este respeito, técnicas adequadas para utilização na divulgação tal como descrita abaixo são descritas em *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates e Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nova Iorque (1991).

Anticorpos para utilização nos métodos de diagnóstico e terapêuticos aqui descritos podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica para a síntese de anticorpos, em

particular, por síntese química ou, de preferência, por técnicas de expressão recombinante, conforme aqui descrito.

Num exemplo, um anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado da divulgação compreende uma região constante de síntese em que um ou mais domínios são parcialmente ou completamente suprimidos ("anticorpos com domínios suprimidos"). Em certos exemplos anticorpos modificados compatíveis compreendem construções ou variantes de domínio suprimido em que a totalidade do domínio C_H2 foi removida (construções Δ C_H2). Para outros exemplos de um péptido curto de ligação pode substituir o domínio suprimido para proporcionar flexibilidade e liberdade de movimento para a região variável. Os peritos na técnica irão apreciar que tais construções são particularmente preferidas devido às propriedades reguladoras do domínio C_H2 da taxa catabólica do anticorpo. Construções com domínios suprimidos podem ser obtidos utilizando um vector (por exemplo, da Biogen IDEC Incorporated) que codifica para um domínio constante de IgG₁ humana (ver, por exemplo, WO 02/060955 A2 e WO02/096948A2. Esse vector exemplo foi desenhado para eliminar o domínio C_H2 e fornecer um vector sintético que expressa uma região constante de IgG₁ com supressão de domínio.

Nalguns exemplos, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da divulgação são "minibodies". "Minibodies" podem ser preparados utilizando métodos descritos na técnica (ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. 5,837,821 ou WO 94/09817A1).

Num exemplo, um anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado da divulgação compreende uma cadeia pesada de imunoglobulina com deleção ou substituição de alguns ou mesmo de um único aminoácido desde

que permita a associação entre as subunidades monoméricas. Por exemplo, a mutação de um único aminoácido em áreas seleccionadas do domínio C_H2 pode ser suficiente para reduzir substancialmente a ligação de Fc e assim aumentar a localização tumoral. Do mesmo modo, pode ser desejável simplesmente excluir aquela parte de um ou mais domínios de região constante que controlam a função efectora (por exemplo, ligação ao complemento) a ser modulada. Tais deleções parciais das regiões constantes podem melhorar as características seleccionadas do anticorpo (soro de meia-vida), enquanto deixam intactas as outras funções desejáveis associadas ao domínio da região constante. Além disso, como mencionado acima, as regiões constantes dos anticorpos divulgados podem ser sintéticas através da mutação ou substituição de um ou mais aminoácidos que melhoram o perfil da construção resultante. A este respeito, pode ser possível afectar a actividade proporcionada por um local de ligação conservado (por exemplo, ligação a Fc), mantendo substancialmente o perfil de configuração e imunogénico do anticorpo modificado. Ainda outros exemplos compreendem a adição de um ou mais aminoácidos para a região constante para melhorar as características desejáveis, tais como a função efectora ou proporcionar uma maior ligação a citotoxina ou a hidrato de carbono. Em tais exemplos, pode ser desejável inserir ou replicar sequências específicas derivadas de domínios de regiões constantes seleccionados.

A presente divulgação também proporciona anticorpos que compreendem, consistem essencialmente em, ou consistir em, variantes (incluindo derivados) de moléculas de anticorpo (por exemplo, as regiões V_H e/ou regiões V_L) aqui descritas, cujos seus anticorpos ou fragmentos se ligam de forma imuno-específica a um polipéptido Sp35 ou seu fragmento ou variante. Técnicas convencionais conhecidas pelos peritos na

técnica podem ser usadas para introduzir mutações na sequência de nucleótidos que codifica para um anticorpo Sp35, incluindo, mas não se limitando a, mutagênese dirigida e mutagênese mediada por PCR, que resultam em substituições de aminoácidos. De preferência, as variantes (incluindo derivados) codificam para menos de 50 substituições de aminoácidos, substituições de menos de 40 aminoácidos, substituições de menos de 30 aminoácidos, substituições de menos de 25 aminoácidos, substituições de menos de 20 aminoácidos, substituições de menos de 15 aminoácidos, substituições de menos de 10 aminoácidos, substituições de menos de 5 aminoácidos, substituições de menos de 4 aminoácidos, substituições de menos de 3 aminoácidos, substituições de menos de 2 aminoácidos em relação à região de referência V_H , V_HCDR1 , V_HCDR2 , V_HCDR3 , região V_L , V_LCDR1 , V_LCDR2 , ou V_LCDR3 . Uma “substituição de aminoácidos conservativa” é aquela em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral com uma carga semelhante. As famílias de resíduos de aminoácidos possuindo cadeias laterais com cargas semelhantes foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo da totalidade ou de parte da sequência codificante, tal como por mutagênese de saturação,

e os mutantes resultantes podem ser rastreados relativamente à actividade biológica para identificar mutantes que retêm a actividade (por exemplo, a capacidade para ligar um polipéptido Sp35).

Por exemplo, é possível introduzir mutações apenas em regiões estruturais ou apenas nas regiões CDR de uma molécula de anticorpo. Mutações introduzidas podem ser mutações silenciosas ou “missense” neutras, ou seja, não têm nenhum ou pouco efeito sobre a capacidade de um anticorpo se ligar ao antigénio. Estes tipos de mutações podem ser úteis para otimizar a utilização de codões, ou melhorar a produção de um anticorpo de hibridoma. Alternativamente, as mutações “missense” não neutras podem alterar a capacidade do anticorpo se ligar ao antigénio. É provável que a localização da maioria das mutações silenciosas e “missense” neutras se situe nas regiões estruturais, enquanto que é provável que a localização da maioria das mutações “missense” não neutras se situe na CDR, embora isso não seja um requisito absoluto. Um perito na técnica seria capaz de conceber e testar as moléculas mutantes com as propriedades desejadas, tais como nenhuma alteração na actividade de ligação ao antigénio ou alteração na actividade de ligação (por exemplo, melhorias na actividade de ligação ao antigénio ou alteração da especificidade do anticorpo). Após mutagénesis, a proteína codificada pode ser rotineiramente expressa e a actividade funcional e/ou biológica da proteína codificada (por exemplo, capacidade para se ligar imuno especificamente a pelo menos um epitopo de um polipéptido Sp35) pode ser determinada utilizando técnicas aqui descritas ou por modificação rotineira de técnicas conhecidas na técnica.

IV. POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAM PARA ANTICORPOS Sp35

A presente divulgação também proporciona moléculas de ácido nucleico que codificam para anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da divulgação.

Num exemplo, a presente divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo num ácido nucleico que codifica para uma região variável da imunoglobulina de cadeia pesada (V_H), em que pelo menos uma das CDR da região variável da cadeia pesada ou pelo menos duas das CDRs da região variável da cadeia pesada são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 ou CDR3 da cadeia pesada de referência de anticorpos Sp35 monoclonais aqui divulgados. Alternativamente, as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 da V_H são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 ou CDR3 da cadeia pesada de referência dos anticorpos Sp35 monoclonais aqui divulgados. Assim, de acordo com este exemplo uma região da cadeia pesada variável da divulgação tem sequências polipeptídicas CDR1, CDR2 ou CDR3 relacionadas com as sequências polipeptídicas apresentadas na Tabela 4:

TABELA 4: Sequências de aminoácidos CDR1, CDR2, e CDR3 V_H de referência *

Nome do anticorpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Li10	P=TYPMV (SEQ ID NO: 6)	P=WIGPSGGVTAYADSVKG (SEQ ID NO: 8)	P=PYSSGWDFDL (SEQ ID NO: 10)
	N=ACTTACCCTATGGTT (SEQ ID NO: 5)	N=TGGATCGGTCCTTCT GGTGGCGTTACTGCTTA TGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 7)	N=CCCTATAGCAGTGGCT GGTGGGACTTCGATCTC (SEQ ID NO: 9)
Li07	P=MYFMG (SEQ ID NO: 12)	P=SISPSGGFTSYADSVKG (SEQ ID NO: 14)	P=DRHAFDI (SEQ ID NO: 16)
	N=ATGTACTTTATGGGT (SEQ ID NO: 11)	N=TCTATCTCTCCTTCTGGTGGCTTTAC TTCTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 13)	N=GATCGGCATGCTTTTGATATC (SEQ ID NO: 15)
Li05	P=AYAMG (SEQ ID NO: 18)	P=SIVSSGGYTDYADSVKG (SEQ ID NO: 20)	P=EGDHNAFDI (SEQ ID NO: 22)
	N=CTTACGCTATGGGT (SEQ ID NO: 17)	N=TCTATCGTTTCTTCTGGTGGCT ATACTGATTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 19)	N=GAGGGTGACCATAATGCTTTT GATATC (SEQ ID NO: 21)

Nome do anticorpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Li11	P=SYAMY (SEQ ID NO: 24)	P=SISTSGGYTGYADSVKG (SEQ ID NO: 26)	P=DTSDNDYMDV (SEQ ID NO: 28)
	N=TCTTACGCTATGTAT (SEQ ID NO: 23)	N=TCTATCTCTACTTCTGGTGGCTA TACTGGTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 25)	N=GATACCAGCGATAATGAC TACTACTACATGGACGTC (SEQ ID NO: 27)
Li101	P=KYQMT (SEQ ID NO: 30)	P=SIYPSGGNTVYADSVKG (SEQ ID NO: 32)	P=GTTEAVFDY (SEQ ID NO: 34)
	N==AAGTACCAGATGACT (SEQ ID NO: 29)	N=TCTATCTATCCTTCTGGTGGCAA TACTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 31)	N=GGGACTACAGAGGCAGTCTT TGACTAC (SEQ ID NO: 33)
Li112	P=QYNMF (SEQ ID NO: 36)	P=RISSSGGTMVYADSVKG (SEQ ID NO: 38)	P=EALRPYCSGGSCSYDYYYGMDV (SEQ ID NO: 40)
	N= CAGTACAATATGTTT (SEQ ID NO: 35)	N= CGTATCTCTTCTTCTGGTGGCAT GACTATGTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 37)	N= GAAGCGTTACGGCCTTATTG TAGTGGTGGTAGCTGCTACTCCG ACTACTACTACTACGGTATGGAC GTC (SEQ ID NO: 39)
Li106	P=EYPMD (SEQ ID NO: 42)	P=SIYSSGGSTVYADSIKG (SEQ ID NO: 44)	P=EGDSDAFDI (SEQ ID NO: 46)
	N=GAGTACCCTATGGAT (SEQ ID NO: 41)	N=TCTATCTATTCTTCTGGTGGCTC TACTGTTTATGCTGACTCCATTAAAGGT (SEQ ID NO: 43)	N=GAGGGTGACTCTGATGCTTTT GATATC (SEQ ID NO: 45)
Li108	P=HYEMV (SEQ ID NO: 48)	P=SIRSSGGATKYADSVKG (SEQ ID NO: 50)	P=ESPDDYFDY (SEQ ID NO: 52)
	N= CATTACGAGATGGTT (SEQ ID NO: 47)	N= TCTATCCGTTCTTCTGGTGGCGCTAC TAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 49)	N= GAGTCGCCAGACGACTACTTT GACTAC (SEQ ID NO: 51)
Li103	P=QYPME (SEQ ID NO: 54)	P=GIYPSGGSTVYADSVKG (SEQ ID NO: 56)	P=AGQWLGDYFDY (SEQ ID NO: 58)
	N=CAGTACCCTATGGAG (SEQ ID NO: 53)	N=GGTATCTATCCTTCTGGTGGCTCTA CTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 55)	N=GCGGGGCAGTGGCTGGGGAC TTTGACTAC (SEQ ID NO: 57)
Li109	P=MYSMV (SEQ ID NO: 60)	P=YISPSGGKTMVYADSVKG (SEQ ID NO: 62)	P=DSRRRYDFWSGYHNYYYYMDV (SEQ ID NO: 64)
	N=ATGTACTCTATGGTT (SEQ ID NO: 59)	N=TATATCTCTCCTTCTGGTGGCAAG ACTATGTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 61)	N=GATTGAGACGCCGCTATTACGA TTTTGGAGTGGTTATCACAACACT ACTACTACTACATGGACGTC (SEQ ID NO: 63)
Li104	P=RYNMG (SEQ ID NO: 66)	P=VIYPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 68)	P=SIADDAFDI (SEQ ID NO: 70)
	N=CGTTACAATATGGGT (SEQ ID NO: 65)	N=GITATCTATCCTTCTGGTGGCGGT ACTCATTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 67)	N=TCTATAGCAGATGATGCTTTTGATATC (SEQ ID NO: 69)
Li102	P=TYEMI (SEQ ID NO: 72)	P=SIGPSGGLTWYADSVKG (SEQ ID NO: 74)	P=MYCVRIDDSGWAFDI (SEQ ID NO: 76)
	N=ACTTACGAGATGATT (SEQ ID NO: 71)	N=TCTATCCGTCCTTCTGGTGGCC TTACTTGGTATGCTGACTCCGTTAA (SEQ ID NO: 73)	N=ATGTATTACTGTGTACGGATTGATGA TAGTAGTGGTTGGCTTTTGATATC (SEQ ID NO: 75)
Li113	P=HYEMY (SEQ ID NO: 389)	P=RIVSSGGFTKYADSVKG (SEQ ID NO: 390)	P=EGDNDAFDI (SEQ ID NO: 391)
Li132	P=AYMMQ (SEQ ID NO: 395)	P=SISPSGGNTKYADSVKG (SEQ ID NO: 396)	P=GDYGYWFDL (SEQ ID NO: 397)
Li133	P=IYPMF (SEQ ID NO: 401)	P=WIGPSGGITKYADSVKG (SEQ ID NO: 402)	P=EGHNDWYFDL (SEQ ID NO: 403)
Li134	P=NYEMY (SEQ ID NO: 407)	P=GIYSSGGITVYADSVKG (SEQ ID NO: 408)	P=AAILDWYFDL (SEQ ID NO: 409)
1A7	P=NYGMN (SEQ ID NO: 77)	P=WINTDTGEPTYTEDFQG (SEQ ID NO: 78)	P=EGVHFDY (SEQ ID NO: 79)
2F3	P=FSDAWLD (SEQ ID NO: 80)	P=EIRSKANNHATNYAESVKG (SEQ ID NO: 81)	P=SFAY (SEQ ID NO: 82)
3P1D10.2C3 e 3P1E11.3B7	P=SSWTQ (SEQ ID NO: 83)	P=AIYPGDGDTTRYTKFKG (SEQ ID NO: 84)	P=HNSYGM DY (SEQ ID NO: 85)
L1a.01	P=GYSFTNYWIG (SEQ ID NO: 195)	P=IIDPDDSYTTYSPSFQG (SEQ ID NO: 196)	P=AEFYWGAYDG (SEQ ID NO: 197)
L1a.02	P=GGsirGNYWS (SEQ ID NO: 198)	P=SINYSGFTNPSLKG (SEQ ID NO: 199)	P=VRHWYFDV (SEQ ID NO: 200)

Nome do anticorpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
L1a.03	P=GYTFNGFDMH (SEQ ID NO: 201)	P=WIDPYNGSTTYAQKFQG (SEQ ID NO: 202)	P=DFYMDGHYYIFDV (SEQ ID NO: 203)
L1a.04	P=GYSFSNYYIH (SEQ ID NO: 204)	P=IIDPGDSFTSYSPSFQG (SEQ ID NO: 205)	P=DLAWIDYGFDY (SEQ ID NO: 206)
L1a.05	P=GFTFTSHTVS (SEQ ID NO: 207)	P=SITGNGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 208)	P=FYGDFDS (SEQ ID NO: 209)
L1a.06	P=GFTFSSNWMS (SEQ ID NO: 210)	P=TIIFYSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 211)	P=DLPMKGFIQQRYGFDV (SEQ ID NO: 212)
L1a.07	P=GFTFSGYAIS (SEQ ID NO: 213)	P=TIWGSSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 214)	P=EYWYDQFTAV (SEQ ID NO: 215)
L1a.08	P=GDSVSSNSAAWS (SEQ ID NO: 216)	P=RIYYRSKWYNDYAVSVKS (SEQ ID NO: 217)	P=EVYSAGIMDY (SEQ ID NO: 218)
L1a.09	P=GYSFTNHWIG (SEQ ID NO: 219)	P=IIDPSDSDTNYSPSFQG (SEQ ID NO: 220)	P=GFYGIADTFDV (SEQ ID NO: 221)
L1a.10	P=GYSFTNYWIA (SEQ ID NO: 222)	P=MIYPDDSDTNYSPSFQG (SEQ ID NO: 223)	P=TNYLGFYDS (SEQ ID NO: 224)
L1a.11	P=GFTFSDYGIS (SEQ ID NO: 225)	P=NILYDGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 226)	P=GYPTDDYSFDI (SEQ ID NO: 227)
L1a.12	P=GDSVSDNSAAWG (SEQ ID NO: 228)	P=RIYYRSKWYNDYAVSVKS (SEQ ID NO: 229)	P=GRHEYGGLGYAEAMDH (SEQ ID NO: 230)
L1a.13	P=GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 231)	P=AISGSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 232)	P=HYTYMHFEDY (SEQ ID NO: 233)
3B5.2	P=SYWMH (SEQ ID NO: 410)	P=VIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO:411)	P=PYYGSHWFFDV (SEQ ID NO:412)
	N=AGCTACTGGATGCAC (SEQ ID NO: 424)	N=GTGATTGATCCTTCT G ATAGTT AT ACT AACT ACAATC AA AAGTTCAGGGGC (SEQ ID NO:425)	N=CCTTACT ACGGT AGTCACT GGTCTTCGATGTC (SEQ ID NO:426)
L181	P=AYEMK (SEQ ID NO: 436) N=GCTTACGAGATGAAG (SEQ ID NO: 439)	P= VIGPSGGFTFYADSVKG (SEQ ID NO:437) N=GTATATCGGTCCTTCTGGTGGCT TTACTTTTATGCTGACTCCGTT AAAGGT (SEQ ID NO:440)	P= EGDNDAFDI (SEQ ID NO:438) N=GAGGGTGATAATGATGC 1'11TGA ATC (SEQ ID NO:441)

*Determinadas pelo sistema de **Kabat** (ver supra).

N=sequência de nucleótido, **P**=sequência de polipéptido.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo a VH codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Noutro exemplo, a presente divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste num ácido nucleico que codifica para uma região variável da imunoglobulina de cadeia pesada (V_H) na qual as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 têm sequências de polipéptidos que sejam idênticas aos grupos CDR1, CDR2 e CDR3 apresentados na Tabela 4. Em certos exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo a VH codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Num exemplo ainda mais adicional da divulgação, a presente divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente de, ou consiste de um ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (VH), em que as regiões de CDR1, CDR2, e CDR3 são codificados por sequências de nucleótidos pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idêntica à das regiões VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina polipeptídeo produzido pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou a VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina polipeptídeo produzido pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito ATCC PTA - 8107).

Noutro exemplo, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste num ácido nucleico que codifica para uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (V_H) no qual as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos que são idênticas às sequências de nucleótidos que codificam para os grupos CDR1, CDR2 e CDR3 apresentados na Tabela 4. Em certos exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VH codificada pelo polinucleótido liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (VH), em que as regiões de CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos pelo menos 80

%, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos ao polinucleótido que codifica a VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica para a VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Em certos exemplos, um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste numa VH codificada por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos liga-se especificamente ou preferencialmente ao mesmo epitopo que o anticorpo monoclonal seleccionado do grupo que consiste em: 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li022), 35-E04 (Li033), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81, ou irá inibir competitivamente um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

Em certos exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente de, ou consiste numa VH codificado por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos, ligando-se especificamente ou preferencialmente a um polipéptido Sp35 ou a um seu fragmento, ou um SP35 polipéptido variante, com uma afinidade

caracterizada por uma constante de dissociação (K_D) não superior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

Noutro exemplo, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo num ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina (VL), onde pelo menos uma das CDRs da região variável da cadeia leve ou, pelo menos duas das CDRs da região variável da cadeia leve é pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica à sequência de aminoácidos CDR1, CDR2 ou CDR3 da cadeia leve de referência de anticorpos Sp35 monoclonais aqui divulgados. Alternativamente, as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 da VL são, pelo menos, 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de referência de anticorpos Sp35 monoclonais aqui divulgados. Assim, de acordo com este exemplo uma região variável de cadeia leve da divulgação tem sequências polipeptídicas CDR1, CDR2 ou CDR3 relacionadas com as sequências de polipéptidos apresentadas na Tabela 5:

TABELA 5: Sequências de aminoácidos CDR1, CDR2, e CDR3 VL de referência *

Nome do anticorpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Li10	P =RASQGIGNWLA (SEQ ID NO: 87)	P =AASSLES (SEQ ID NO: 89)	P =QQAQTFPLT (SEQ ID NO: 91)
	N =CGGGCGAGTCAGGG TATTGGCAACTGGTTAGCC (SEQ ID NO: 86)	N =GCTGCATCCAGTTGGAAAGT (SEQ ID NO: 88)	N =CAACAGGCTCAGAC TTTCCCGCTCACC (SEQ ID NO: 90)
Li07	P =SGDQLGDKHVA (SEQ ID NO: 93)	P =LDIKRPA (SEQ ID NO: 95)	P =QAWDIKTV (SEQ ID NO: 97)
	N =TCTGGAGATCAGTTG GGTGACAAACATGTGGCT (SEQ ID NO: 92)	N =CTAGACATTAAGAGGCCCGCA (SEQ ID NO: 94)	N =CAGGCGTGGGACATC AAGACGGTC (SEQ ID NO: 96)

Nome do anticorpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Li05	P=GGDNIGSKSVH (SEQ ID NO: 99)	P=DDYDRPS (SEQ ID NO: 101)	P=QVRDSRTERV (SEQ ID NO: 103)
	N=GGGGGAGACAAACAT TGGAAGTAAGAGTGTCCAC (SEQ ID NO: 98)	N=GATGATTATGACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 100)	N=CAGGTGAGGGACAGCCG TACTGAGGAACGGGTG (SEQ ID NO: 102)
Li11	P=RASQEIANLYLA (SEQ ID NO: 105)	P=DTYTLQT (SEQ ID NO: 107)	P=QQADIFPLS (SEQ ID NO: 109)
	N=CGGGCGAGTCAGGAG ATTGCCAACTACTTAGCC (SEQ ID NO: 104)	N=GATACATACACTTTGCAGACT (SEQ ID NO: 106)	N=CAACAGGCTGACATTTT CCCGCTCTCT (SEQ ID NO: 108)
Li01	P=QASQDISNYLN (SEQ ID NO: 111)	P=DASNLET (SEQ ID NO: 113)	P=QQADRFPAVT (SEQ ID NO: 115)
	N=CAGGCGAGTCAGGA CATTAGCAACTATTTAAAT (SEQ ID NO: 110)	N=GATGCATCCAATTGGAAACA (SEQ ID NO: 112)	N=CAACAGGCTGACAGGTTT CCTGCGGTCACT (SEQ ID NO: 114)
Li06	P=RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 117)	P=AASSLRT (SEQ ID NO: 119)	P=LQDYSYPLT (SEQ ID NO: 121)
	N=CGGGCCAGTCAGAGTA TTAGTAGCTGGTTGGCC (SEQ ID NO: 116)	N=GCTGCATCCAGTTTACGAACT (SEQ ID NO: 118)	N=CTACAAGATTACAGTTAC CCTCTCACT (SEQ ID NO: 120)
Li08	P=QASQDISYYLN (SEQ ID NO: 123)	P=DVSNLQT (SEQ ID NO: 125)	P=QQSDNLPLT (SEQ ID NO: 127)
	N=CAGGCGAGTCAGGAC ATTAGTTACTATTAAAT (SEQ ID NO: 122)	N=GATGTATCCAATTGCAAACA (SEQ ID NO: 124)	N=CAACAGTCTGATA ATCTCCCTCTCACT (SEQ ID NO: 126)
Li03	P=RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 129)	P=AASSLQS (SEQ ID NO: 131)	P=QQSYSTPWT (SEQ ID NO: 133)
	N=GGGCAAGTCAGAGC ATTAGCAGCTATTTAAAT (SEQ ID NO: 128)	N=GCTGCATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 130)	N=CAACAGAGTTACA GTACCCCGTGGACG (SEQ ID NO: 132)
Li09	P=RASQSIDTYLN (SEQ ID NO: 135)	P=AASKLED (SEQ ID NO: 137)	P=QQSYSPPLT (SEQ ID NO: 139)
	N=CGGCAAGTCAGAGC ATCGACACCTATTTAAAT (SEQ ID NO: 134)	N=GCTGCATCCAAGTTGGAAGAC (SEQ ID NO: 136)	N=CAACAGAGTTACAG TCCCCCTCTCAC (SEQ ID NO: 138)
Li02	P=SGDKLGDKFAS (SEQ ID NO: 141)	P=QDRKRLS (SEQ ID NO: 143)	P=QAWDTNTVV (SEQ ID NO: 145)
	N=TCTGGAGATAAATTGG GGGATAAATTGCTTCC (SEQ ID NO: 140)	N=CAAGATAGGAAGCGTCTCTCA (SEQ ID NO: 142)	N=CAGGCGTGGGACA CCAACACTGTGGTC (SEQ ID NO: 144)
Li113	P=RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 386)	P=DASNRAT (SEQ ID NO: 387)	P=QQRSNWPMYT (SEQ ID NO: 388)
Li132	P=QASQDISYYLN (SEQ ID NO: 392)	P=DAFILEG (SEQ ID NO: 393)	P=QQSDQLPVT (SEQ ID NO: 394)
Li133	P=RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 398)	P=DASNRAT (SEQ ID NO: 399)	P=QQYDKWPLT (SEQ ID NO: 400)
Li134	P=HASQDISNYLS (SEQ ID NO: 404)	P=DAFNLET (SEQ ID NO: 405)	P=QHYDNLFFT (SEQ ID NO: 406)
1A7	P=SASSSVSYMH (SEQ ID NO: 146)	P=DTSKLAS (SEQ ID NO: 147)	P=QQWSSNPFT (SEQ ID NO: 148)
2F3	P=RASGNIYNYLA (SEQ ID NO: 149)	P=NAKTLPD (SEQ ID NO: 150)	P=QHFWAIPYT (SEQ ID NO: 151)
3P1D10.2C3	P=KSSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 152)	P=WASTRES (SEQ ID NO: 153)	P=QNDYSYPLFT (SEQ ID NO: 154)
3P1E11.3B7	P=KSSQSLNLSGNQKSYLT (SEQ ID NO: 155)	P=WASTRES (SEQ ID NO: 156)	P=QNDYSYPLFT (SEQ ID NO: 157)
L1a.01	P=SGDSLPSKFVH (SEQ ID NO: 234)	P=RDNNRPS (SEQ ID NO: 235)	P=SSYDALTD (SEQ ID NO: 236)
L1a.02	P=RASQSITNSYLG (SEQ ID NO: 237)	P=DASSRAT (SEQ ID NO: 238)	P=QQASDAPE (SEQ ID NO: 239)
L1a.03	P=RASQGINFVLN (SEQ ID NO: 240)	P=AGSNLQS (SEQ ID NO: 241)	P=MQDSDFPF (SEQ ID NO: 242)
L1a.04	P=TGSSSNIGAGYDVS (SEQ ID NO: 243)	P=RNNNRPS (SEQ ID NO: 244)	P=QTYDNSTD (SEQ ID NO: 245)
L1a.05	P=SGDNIRSYYVH (SEQ ID NO: 246)	P=EDSNRPS (SEQ ID NO: 247)	P=QSYDSAILLH (SEQ ID NO: 248)

Nome do anticorpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
L1a.06	P =RSSQSLVLRGTGYTLN (SEQ ID NO: 249)	P =LVSNRAS (SEQ ID NO: 250)	P =QQYYGMPL (SEQ ID NO: 251)
L1a.07	P =RASQSVSYQYLA (SEQ ID NO: 252)	P =GASSRAT (SEQ ID NO: 253)	P =QQYGSVPR (SEQ ID NO: 254)
L1a.08	P =SGDSLGSYYVH (SEQ ID NO: 255)	P =DDNDRPS (SEQ ID NO: 256)	P =SAYDYSART (SEQ ID NO: 257)
L1a.09	P =SGDNLGSKYVS (SEQ ID NO: 258)	P =DDDDRPS (SEQ ID NO: 259)	P =SSYDFLNIGL (SEQ ID NO: 260)
L1a.10	P =SGDSLGGKSVH (SEQ ID NO: 261)	P =EDSERPS (SEQ ID NO: 262)	P =SSYTNSVD (SEQ ID NO: 263)
L1a.11	P =SGDNLGKKYVG (SEQ ID NO: 264)	P =DDNDRPS (SEQ ID NO: 265)	P =QSYDDTSI (SEQ ID NO: 266)
L1a.12	P =SGDSLGNKYVH (SEQ ID NO: 267)	P =DDSDRPS (SEQ ID NO: 268)	P =QTWDYVGY (SEQ ID NO: 269)
L1a.13	P =TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 270)	P =DVSNRPS (SEQ ID NO: 271)	P =QSYDRYRLKN (SEQ ID NO: 272)
3B5.2	P =SASSRVSYVH (SEQ ID NO:413)	P =DTSNLAS (SEQ ID NO:414)	P =QQWSTNPPT (SEQ ID NO:415)
	N =AGTGCCAGCTCAC GTGTAAGTTACGTG CAC (SEQ ID NO:427)	N =GACACATCCAAC CTGGCTTCT (SEQ ID NO:428)	N =CAGCAGTGGAGTA CTAACCACCCACG (SEQ ID NO:429)
Li81	P =RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:442) N =AGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCTACT TAGCC (SEQ ID NO:445)	P =DASNRAT (SEQ ID NO:443) N =GATGCATCCAACAGGC CACT (SEQ ID NO:446)	P =QQRSNWPMYT (SEQ ID NO: 444) N =CAGCAGCGTAGCAACTGG CGATGTACACT (SEQ ID NO:447)

*Determinado pelo sistema de Kabat (ver *supra*).

N=sequência de nucleótido, **P**=sequência de polipéptido.

Em certos exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo a VL codificado pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (VL), em que as regiões de CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos ao polinucleótido que codifica a VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica para a VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de

imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Noutro exemplo, a divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo num ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina (VL) na qual as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 têm sequências de polipéptidos que são idênticas aos grupos CDR1, CDR2 e CDR3 apresentados na Tabela 5. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VL codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Noutro exemplo, a presente divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo num ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina (VL) na qual as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos que são idênticas às sequências de nucleótidos que codificam para os grupos CDR1, CDR2 e CDR3 apresentados na Tabela 5. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VL codificado pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (VL), em que as regiões de CDR1, CDR2, e CDR3

são codificadas por sequências de nucleótidos pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos ao polinucleótido que codifica a VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica para a VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste num VL codificado por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos liga-se especificamente ou preferencialmente ao mesmo epitopo que um anticorpo monoclonal anticorpo seleccionado de entre o grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81 ou irá inibir competitivamente um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste num VL codificado por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos, liga-se especificamente ou preferencialmente a um polipéptido Sp35 ou a de um seu

fragmento, ou a um polipéptido variante Sp35, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (K_D) não superior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consistindo num ácido nucleico que codifica para uma VH que é pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência de polipéptido de referência VH seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380, e 384 e 416 apresentadas na Tabela 6. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VH codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste numa sequência de ácido nucleico que codifica para VH com uma sequência de polipéptido seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380 e 384 e 416 apresentadas na Tabela 6. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VH codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

TABELA 6 - Sequências de polipéptido VH

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li 02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYEMIWVRQAPGKGLEWVSSIGP SGGLTWYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIDSSGW AFDIWGQGTTITVSSASTKGPSVFPLAP	158
Li 09	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYSMVWVRQAPGKGLEWVSYIS PSGGKTM YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD SRRRY YDFWSGYHNYYYMDVWGKGTTITVSSASTKGPSVFPLAP	159
Li 06	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYPMDWVRQAPGKGLEWVSSIY SSGGSTVYADSIKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDSDAF DIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP	160
Li 05	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMGWVRQAPGKGLEWVSSIV SSGGYTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDHNA FDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP	161
Li 04	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMGWVRQAPGKGLEWVSVIY PSGGGTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSIADDAF DIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP	162
Li 08	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYEMVWVRQAPGKGLEWVSSIRS SGGATKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKESPDYF DYWGQGTILTVTVSSASTKGPSVFPLAP	163
Li 11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMYWVRQAPGKGLEWVSSIST SGGYTG YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTSDNDY YYMDVWGKGTTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	164
Li 10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYPMVWVRQAPGKGLEWVSWIG PSGGVTAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPYSSGW WDFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAP	165
Li 01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYQMTWVRQAPGKGLEWVSSIY PSGGNTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGTTEAV FDYWGQGTILTVTVSSASTKGPSVFPLAP	166

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li 07	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYFMGWVRQAPGKGLEWVSSIS PSGGFTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRHAFD IWQGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAP	167
Li 03	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYPMWVRQAPGKGLEWVSGIY PSGGSTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGQWL GDFDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAP	168
Li 12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYNMFWRQAPGKGLEWVSRIS SGGMTMYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREALRPY CSGGSCYSDDYGYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	169
1A 7	QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGW INTDTGEPTYTEDFQGRFAFSLETSASTVYLQFNNLKNEDTATYFCAREGVHF DYWGQGTITVTVSS	170
2F 3	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWLDWVRQSPEKGLEWVAEIR SKANNHATNYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYFCTPSFAYW GQGTITVTVSS	171
3P 1D 10 .2 C3 e 3P 1E 11 .3 B7	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCRASGYTFTSSWTQVWKQRPGQGLEWIGAIY PGDGDTRYTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSSLASEDSAVYYCARHNSYG MDYWGQGTISVTVSS	172
Li 13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYEMYWVRQAPGKGLEWVSRIVS SGGFTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEGDNDAFD IWQGQGTITVTVSS	372
Li 32	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYMMQWVRQAPGKGLEWVSSISP SGGNTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYGWFD PWGQGTILVTVSS	376
Li 33	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYPMFWRQAPGKGLEWVSWIGP SGGITKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAREGHNDWYF DLWGRGTLTVTVSS	380
Li 34	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYEMYWVRQAPGKGLEWVSGIYS SGGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAILDWYF DLWGRGTLTVTVSS	384
3B 5. 2	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCRASGYTFTSYWMHWKQRPGQGLEWIGVIDP SDSYT NYNQKFRGKATLTVDTSSTAYMQLSSSLTSEDSAVYYCARPYGSHWFFDVWG TGTITVTVSS	416

VH	Sequência	SEQ ID NO:
P1 A7 VA R. 2	QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVQAPGQGLKWMGWINT DTGEPTYTEDFQGRFVFSIDTSASTvYLQISSLKAEDMAMYYCAREGVHFDYW GQGTILVTVSS	432
Li 8 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYEMKWVRQAPGKGLEWVSVIGP SGGFTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEGDNDAFD TWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTIVLHQLDNLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	433
Li 8 1 (a gl yc o sy l At ed)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYEMKWVRQAPGKGLEWVSVIGP SGGFTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEGDNDAFD IWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRWSVLTIVLHQLDNLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	435

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou consistindo num ácido nucleico que codifica para uma VH que é pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência de polipéptido de referência VH seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 158-172, 372, 376, 380, e 384 e 416. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VH codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste numa sequência de ácido nucleico que codifica para uma VH da divulgação, seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 158-172, 372,

376, 380, e 384 e 416. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VH codificado pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (VH), em que as regiões de CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos ao polinucleótido que codifica a VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica para a VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Nalguns exemplos, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente de, ou que consiste numa VH codificada por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos, liga-se especificamente ou preferencialmente ao mesmo epitopo que um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo constituído por, (201') 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570

(L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3569 (L1a.3), 3564 (L1a.10) 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13, 7P1D5.1G9) e 3B5.2 ou inibirá competitivamente um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste numa VH codificada por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos liga-se especificamente ou preferencialmente a um polipéptido Sp35 ou a um seu fragmento, ou a um polipéptido Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (K_D) não superior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

Em exemplos adicionais, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado que codifica para uma cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende, que consiste essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada de menos, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticos ao polinucleótido de SEQ ID NO: 420, como mostrado abaixo. Em certos casos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a cadeia pesada codificada pelo polinucleótido especificamente ou liga-se preferencialmente a Sp35 e ou ao mesmo epitopo que o anticorpo monoclonal 3B5.2.

Sequência de polinucleotídeo de cadeia pesada de imunoglobulina humana para anticorpo monoclonal murino quimérico 3B5.2:

ATGGGATGGAGCTGTGTAATGCTCTTGGTATCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCA
GGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTCAGTGAAG
TTGTCCTGCAGGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAA
GCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAGTGATTGATCCTTCTGATAGTT
ATACTAACTACAATCAAAAGTTCAGGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACACATC
CTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCT
ATTACTGTGCAAGACCTTACTACGGTAGTCACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCACA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT
GGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA
GCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTG
TGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCC

TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA (SEQ ID NO:420).

Em exemplos adicionais, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado que codifica para uma região variável de cadeia pesada (V_H), em que o polinucleótido compreende uma sequência de ácido nucleico V_H seleccionada do grupo consistindo em nas SEQ ID NOs 173 a 184, 370, 374, 378 e 382, e 422 como apresentado na Tabela 7. Em certos exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a V_H codificada pelo polinucleótido liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

TABELA 7 - Sequências Polinucleotídicas VH

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li0 2	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTACTTACGAGATGATTTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCGGTCTTCTGGTGGCCTTACT TGGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGCCATGTATTACTGTGT ACGGATTGATGATAGTAGTGGTTGGGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC ACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	173
Li0 9	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTATGTACTCTATGGTTTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTATATCTCTCCTTCTGGTGGCAAGACT ATGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATA CTTTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GAGAGATTTCGAGACGCCGGTATTACGATTTTTGGAGTGGTTATCACAACCTACTACTAC TACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	174
Li0 6	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTGAGTACCCTATGGATTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTATCTTCTTCTGGTGGCTCTACT GTTTATGCTGACTCCATTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC CAGAGAGGGTGACTCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTC TCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	175
Li0 5	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTGCTTACGCTATGGGTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCGTTTCTTCTGGTGGCTATACT GATTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC CAGAGAGGGTGACCATAATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTC TCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	176
Li0 4	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCGTTACAATATGGGTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGTTATCTATCCTTCTGGTGGCGGTACT CATTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GAGTTCTATAGCAGATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTC TCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	177
Li0 8	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCATTACGAGATGGTTTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCCGTTCTTCTGGTGGCGCTACT AAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GAAAGAGTCGCCAGACGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	178
Li1 1	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTTCTTACGCTATGTATTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTACTTCTGGTGGCTATACT GGTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GAGAGATACCAGCGATAATGACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACG GTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	179

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li10	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCTGGTGGTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTACTTACCCTATGGTTTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTGGATCGGTCTTCTGGTGGCGTTACT GCTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GAGACCCTATAGCAGTGGCTGGTGGGACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTC ACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	180
Li101	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCTGGTGGTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTAAGTACCAGATGACTTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTATCCTTCTGGTGGCAATACT GTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GAGTGGGACTACAGAGGCAGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	181
Li107	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCTGGTGGTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTATGTACTTTATGGGTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTCCTTCTGGTGGCTTTACT TCTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGC GAGAGATCGGCATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAAGC GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	182
Li103	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCTGGTGGTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCAGTACCCTATGGAGTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGGTATCTATCCTTCTGGTGGCTCTACT GTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GAGAGCGGGGCAGTGGCTGGGGGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC GTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	183
Li112	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCTGGTGGTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCAGTACAATATGTTTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTCGTATCTCTTCTTCTGGTGGCATGACT ATGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC GAGAGAAGCGTTACGGCCTTATTGTAGTGGTGGTAGCTGCTACTCCGACTACTACTAC TACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	184
Li113	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCTGGTGGTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCATTACGAGATGTATTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTCGTATCGTTTCTTCTGGTGGCTTTACT AAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC AACAGAGGGTGATAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCAAGC	370
Li132	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCTGGTGGTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTGCTTACATGATGAGTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTATCTCTCCTTCTGGTGGCAATACT AAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GAGAGGAGATTATGGATACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTC TCAAGC	374
Li133	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCTGGTGGTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTATTTACCCTATGTTTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTGGATCGGTCTTCTGGTGGCATTACT AAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGC GAGAGAGGGGCATAACGACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACC GTCTCAAGC	378

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li3 4	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTAGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTAATTACGAGATGTATTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGGTATCTATTCTTCTGGTGGCATTACT GTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC TAGGGCAGCCATCTCGACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACC GTCTCAAGC	382
3B5 .2	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGGACTTCAGTGAAGT TGTCTGTCAGGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAGCA GAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAGTGATTGATCCTTCTGATAGTTATACT AACTACAATCAAAAGTTCAAGGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCA CAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGC AAGACCTTAC TACGGTAGTCACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCT CA	422
Li8 1	GAAGTACAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTAGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTGCTTACGAGATGAAGTGGGTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGTTATCGGTCCTTCTGGTGGCTTTACT TTTTA TGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATACTCTC TACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAG AGGGTGATAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAG CGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGGCTGTCTTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAT CTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGT	448

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li8 1 Agl y Cos y Lat e d	GAAGTACAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTC TTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTGCTTACGAGATGAAGTGGGTTTCGCCA AGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGTTATCGGTCCTTCTGGTGGCTTTACT TTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATA CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC AACAGAGGGTGATAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCT CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGAGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCA CCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTCACCCTCC TGACACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT TCCCGGT	450

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente de, ou que consiste num ácido nucleico que codifica para VH que é pelo menos, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a uma sequência de ácido nucleico de referência seleccionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 173-184, 370, 374, 378, 382 e 422 da Tabela 7. Nalguns exemplos, o polinucleótido codifica para um polipéptido VH que se liga especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste numa VH codificada por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos, liga-se especificamente ou preferencialmente ao mesmo epítipo que um anticorpo monoclonal seleccionado de entre o grupo constituído por, (201') 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9,

3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 3B5.2 E (Li81 ou inibirá competitivamente um tal anticorpo monoclonal de se ligar ao Sp35.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste numa VH codificada por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos, liga-se especificamente ou preferencialmente a um polipéptido Sp35 ou a um seu fragmento, ou um polipéptido Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (K_D) não superior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica um (VH) pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos à sequência de polinucleótido de referência selecionada do grupo consistindo na codificação de polinucleótido da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica para a VH CDR1, CDR2 e

CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste num ácido nucleico que codifica para uma VL pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência de polipéptido VL de referência seleccionada de entre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381 e 385 e 417, apresentadas na Tabela 8. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VL codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste numa sequência de ácido nucleico que codifica para VL possuindo uma sequência de polipéptido seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385 e 417, apresentadas na Tabela 8. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VL codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

TABELA 8 - Sequências Polipeptídicas VL

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li0 2	FYSHSAQYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFASWYQQKAGQSPVLV IFQDRKRLSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTNTVVFGGGTKLTV LGQPKAAP	273
Li0 9	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSAFVGDRVAITCRASQSIDTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS KLEDGVPSRFSGSGTGTDFTLTIRSLQPEDFGTYTCQQSYSPPLTFGGGTKVEIKRTVA AP	274
Li0 6	FYSHSAQDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAAS SLRTGVPSRFRGSGSGTGTDFLTITSSLPEDFATYYCLQDYSYPLTFGGGTKLEIKRTVA AP	275

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li05	FYSHSAQSVLTQPPSVSVAPGQTARISCGGDNIGSKSVHWYQQRPGQAPVLVYDDYDR PSGIPERFSGSNSGDTAILTITRVEVGDEADFYCQVRDSRTEERVFGGGTKVTVLGQPK AAP	276
Li08	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISYYLNWYQQKPGKAPKVLIIYDVS NLQITGVPSRFSGSASATDFTLTISLQPEDATYYCQQSDNLPLTFGGGKVEIKRTVA AP	277
Li11	FYSHSAQDIQMTQSPSSVSAPIGDRVTITCRASQEIANYLAWYQQKPGKAPK LLIIYDTYTLQTDVPPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDTATYFCQQADIFPLSFG GGTKVEIKRTVAAP	278
Li10	FYSHSAQDIQMTQSPSSMSASVGDTVITITCRASQGIGNWLAWYQQKPGKAP TLLIYAASSLESQVPSRFTGSGSSSGIDFTLTISDLHPEDLATYYCQQAQTFPLTFGGG TRVDLKRTVAAP	279
Li01	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDAS NLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQADRFPVTFGGGKVEIKRTV AAP	280
Li07	FYSHSAQSELTQPPSVSVSPGQTAIITCSGDQLGDKHVAWYQQKPGQSPVLVIYLDIKR PAGISERFSGSNSGNTATLTIRGTQAMDEADYYCQAWDIKTVFGGGTKLTVLSQPKAAP	281
Li03	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGGQGTKVEIKRTVA AP	282
1A7	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIK	283
2F3	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIYNYLAWFQQKQKSPQLLVYNAKTLPDGVP SRFSGSGSGTQYFLKINSIQPEDFGSYCQHFWAIPYTFGGGKLE IKR	284
3P1 D10 .2C 3	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLFTFGSGTKLEIR	285
3P1 E11 .3B 7	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSYLTWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLF TFGSGTKLEIR	286
Li13	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIP ARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSNWPMYTFGQGTKLEIK	373
Li12	DIQMTQSPDLSASVGDRVTITCQASQDISYYLNWYQQKPGMAPKLLIYDAFILEGGAP SRFSGSGSGTDFSTISNLQPEDATYFCQQSDQLPVTFGQGTKVEIR	377
Li13	DIQMTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIP ARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYDKWPLTFGGGKVEIK	381
Li13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDISNYLSWYQQKPGKAPKLLIYDAFNLETGVP SRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCQHYDNLPTFTFGPGTRVAIR	385
3B5 .2	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSRVSVHWYQQKSGTSPKRWL YDTSNLASGVPARFNGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQQWSTNP PTFGGKLEIK	417
P1A 7va r.1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRrLIY DTSKLASGIPARFSGSGSGTDyTLTISLSEPEDFAVYYCQQWSSNPFTF GQGTKVEIK	430
P1A 7va r.2	q1VLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRrLIYD TSKLASGIPARFSGSGSGTDyTLTISLSEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFG QGTKVEIK	431

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li8 1	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPM YTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPRE AKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVIYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	434

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consistindo num ácido nucleico que codifica para VL pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência polipeptídica de referência VL seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385 E 417 como mostrado na Tabela 8.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VL codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste numa sequência de ácido nucleico que codifica para VL da divulgação, seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385 e 417. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a VL codificada pelo polinucleótido liga-se preferencialmente ou especificamente a Sp35.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica um VL pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 %

idênticos à sequência de polinucleótido VL de referência selecionada do grupo consistindo na codificação de polinucleótido da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) e o polinucleótido de cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (VH), em que as regiões de CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos ao polinucleótido que codifica a VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica para a VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Nalguns exemplos, um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste num VL codificado por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos, liga-se especificamente ou preferencialmente ao mesmo epitopo que o anticorpo monoclonal seleccionado de entre o grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07

(Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81 ou irá inibir competitivamente um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste num VL codificado por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos, liga-se especificamente ou preferencialmente a um polipéptido Sp35 ou a um seu fragmento, ou a um polipéptido Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (K_D) não superior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

Em exemplos adicionais, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado que codifica para uma cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende, que consiste essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada de menos, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticos ao polinucleótido de SEQ ID NO: 421, como mostrado abaixo. Em certos casos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo a cadeia pesada codificada pelo polinucleótido especificamente ou liga-se preferencialmente a Sp35 e ou ao mesmo epitopo que o anticorpo monoclonal 3B5.2.

Sequência de polinucleotídeo de cadeia pesada de imunoglobulina humana para anticorpo monoclonal murino quimérico 3B5.2:

TGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAG
AGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTC
ACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCACGTGTAAGTTACGTGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAG
GCACCTCCCCCAAAGATGGCTTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCG
CTTCGGTGGCAATGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAA
GATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTACTAACCCACCCACGTTCCGGAGGGGGA
CCAAGCTGGAAATAAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA
GAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAA
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO:421).

Em exemplos adicionais, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado que codifica para uma região variável de cadeia leve (V_L), em que o polinucleótido compreende uma sequência de ácido nucleico V_L seleccionada do grupo consistindo em nas SEQ ID NOs 185 a 194, 371, 375, 379 e 383, e 423 como apresentado na Tabela 9. Em certos exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo a V_L codificada pelo polinucleótido liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

TABELA 9 - Sequências de Polinucleótido V_L

VL	Sequência	SEQ ID NO:

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li 02	TTCTATTCTCACAGTGCACAGTACGAATTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCC AGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATTGCTTCCT GGTATCAGCAGAAGGCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTTTCAAGATAGGAAGCGT CTCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGAC CATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTGAGGCGTGGGACACCA ACACTGTGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTAGGTGAGCCCAAGGCTGCC CCC	185
Li 09	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATTTGTGGGAGACAGAGTCGCCATCACTTGCCGCGCAAGTCAGAGCATCGACACCTATT TAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCC AAGTTGGAAGACGGGGTCCCATCAAGATTGAGTGGCAGTGGAACTGGGACAGATTTTAC TCTACCATCAGAAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACTTACTACTGTCAACAGAGTT ACAGTCCCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCT GCACCA	186
Li 06	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGT TGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTACGAACTGGGGTCCCATCAAGATTGAGGGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTTAC TCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACGTATTACTGTCTACAAGATT ACAGTTACCCTCTCACTTTTGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCT GCACCA	187
Li 05	TTCTATTCTCACAGTGCACAGAGCGTCTTGACTCAGCCACCCTCGGTGTGAGTGGCCCC AGGCCAGACGGCCAGGATTTCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAGAGTGTCCACT GGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGGCCCTGTCTGCTGGTCGTGTATGATGATTATGACCGG CCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGGACACGGCCATCTGAC CATCACCAGGGTCTGAAGTCGGGGATGAGGCCGACTTTTATTGTGAGGTGAGGGACAGCC GTACTGAGGAACGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCTTAGGTGAGCCCAAG GCTGCCCCC	188
Li 08	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGTTACTATT TAAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCCTAAGGTCCTGATCTACGATGTATCC AATTTGCAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTGAGTGGAAAGTGCCTCTGCGACAGATTTTAC TCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCGACATATTACTGTCAACAGTCTG ATAATCTCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATTAAACGAACTGTGGCT GCACCA	189
Li 11	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGC ACCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGAGATTGCCAACTACT TAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATACATAC ACTTTGCAGACTGACGTCCCAACCGAGGTTGAGCGGCAGTGGTTGCGGGACAGATTTTAC TCTACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATACTGCAACTTACTTTTGTCAACAGGCTG ACATTTTCCCGCTCTCTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCT GCACCA	190
Li 10	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTCTGC TTCTGTAGGGGACACAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTGGCAACTGGT TAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGGAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACCGGCAGCGGCAGTTCTCTGGGATAGA TTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGCACCCTGAAGATTTGGCAACTTACTATTGTCAAC AGGCTCAGACTTTCCCGCTCACCTTCGGCGGAGGGACAGGGTGGACCTCAAGCGAACT GTGGCTGCACCA	191
Li 01	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATT TAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCC AATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTG ACAGGTTCCCTGCGGTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTG GCTGCACCA	192

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li 07	TTCTATTCTCACAGTGCACAGAGCGAATTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCC AGGACAGACAGCCATCATCACCTGCTCTGGAGATCAGTTGGGTGACAAACATGTGGCTT GGTATCAACAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCTAGACATTAAGAGG CCCGCAGGGATTCTTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGAAATACAGCCACTCTGAC CATCAGAGGGACCCAGGCTATGGATGAAGCTGACTATTACTGTGAGGCGTGGGACATCA AGACGGTCTTCGGCGGGGGACCAAGCTGACCGTCTGAGTCAGCCCAAGGCTGCCCCC	193
Li 03	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATT TAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC TCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTT ACAGTACCCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCT GCACCA	194
Li 13	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCA GCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA GCCTGAAGATTTTGCAAGTTTATTACTGTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGATGTACACTT TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	371
Li 32	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCAGGCGAGTCAAGACATTAGCTACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAC CAGGGATGGCCCCCTAAACTCCTCATCTACGATGCCTTCATTTTGGAAGGAGGGGCCCCA TCACGGTTCAGTGGGAGCGGCTCTGGGACAGATTTTCTTTTACCATCAGCAATCTACA GCCTGAGGATATTGCAACTTATTCTGTCAACAGTCTGATCAACTGCCCCTGACCTTCG GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAGA	375
Li 33	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCA GCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCTGTAGGATTTTGCAAGTTTATTACTGTGTCAGCAGTATGATAAGTGGCCGCTCACTTTCG GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	379
Li 34	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCATGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAAGTTGGTATCAGCAGAAAC CAGGTAAAGCCCCCTAAACTCCTGATCTACGATGCTTTCAATTTGGAGACAGGAGTCCCA TCGAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGCACAGATTTTACATTACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACATATTACTGTGTCAGCACTATGATAATCTCCATTCACTTTCG GCCCTGGGACCAGAGTGGCGATCAGA	383
3B 5. 2	CAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAG AAGGTACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCACGTGTAAGTTACGTGCACTGG TACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGCTTTATGACACATCC AACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCGGTGGCAATGGGTCTGGGACC TCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTAT TACTGCCAGCAGTGGAGTACTAACCACCCACGTTTCGGAGGGGGGACCAAG CTGGAATAAAAA	423
Li 81	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA TCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTT TATTACTGTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGATGTACACTTTTGGCCAGGGG ACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG	449

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polinucleótido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste num ácido nucleico que codifica uma VL pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a um polinucleótido VL seleccionado de entre o grupo constituído por SEQ ID NOs: 185-194, 371, 375, 379, 383 e 423 da Tabela 9. Nalguns exemplos, o polinucleótido codifica para um polipéptido VL que se liga especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste num VL codificado por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos, liga-se especificamente ou preferencialmente ao mesmo epitopo que o anticorpo monoclonal seleccionado de entre o grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495 (L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 3B5.2 E Li81 ou irá inibir competitivamente um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste num VL codificado por um ou mais dos polinucleótidos acima descritos, liga-se especificamente ou

preferencialmente a um polipéptido Sp35 ou a um seu fragmento, ou a um polipéptido Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (K_D) não superior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica um VL, pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos a uma sequência de polinucleótido VL de referência selecionada do grupo que consiste na codificação de polinucleótido cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica a cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Qualquer um dos polinucleótidos acima descritos pode ainda incluir ácidos nucleicos adicionais, que codificam, por exemplo, para um péptido sinal para dirigir a secreção do polipéptido codificado, regiões constantes dos anticorpos, tal como aqui descrito, ou de outros polipéptidos heterólogos como aqui descrito.

Além disso, tal como descrito em mais detalhe noutra secção deste documento, a presente divulgação inclui composições que compreendem os polinucleótidos compreendendo um ou mais dos polinucleótidos acima descritos. Num exemplo, a divulgação

inclui composições que compreendem um primeiro polinucleótido e um segundo polinucleótido em que o referido primeiro polinucleótido codifica para um polipéptido VH tal como aqui descrito e em que o referido segundo polinucleótido codifica para um polipéptido VL, como aqui descrito. Especificamente, uma composição que compreende, consiste essencialmente em, ou consiste num polinucleótido VH, como apresentado na Tabela 7, e um polinucleótido VL, como apresentado na Tabela 9, em que o referido polinucleótido VH e o referido polinucleótido VL são seleccionados a partir do grupo constituído por:

- i) SEQ ID NO: 173 e SEQ ID NO: 185;
- ii) SEQ ID NO: 174 e SEQ ID NO: 186;
- iii) SEQ ID NO: 175 e SEQ ID NO: 187;
- iv) SEQ ID NO: 176 e SEQ ID NO: 188;
- v) SEQ ID NO: 178 e SEQ ID NO: 189;
- vi) SEQ ID NO: 179 e SEQ ID NO: 190;
- vii) SEQ ID NO: 180 e SEQ ID NO: 191;
- viii) SEQ ID NO: 181 e SEQ ID NO: 192;
- ix) SEQ ID NO: 182 e SEQ ID NO: 193;
- x) SEQ ID NO: 183 e SEQ ID NO: 194;
- xi) SEQ ID NO: 370 e SEQ ID NO: 371;
- xii) SEQ ID NO: 374 e SEQ ID NO: 375;
- xiii) SEQ ID NO: 378 e SEQ ID NO: 379;
- xiv) SEQ ID NO: 382 e SEQ ID NO: 385;
- xv) SEQ ID NO: 422 e SEQ ID NO: 423;
- xvi) SEQ ID NO: 448 e SEQ ID NO: 449, e
- xvii) SEQ ID NO: 450 e SEQ ID NO: 449.

A presente divulgação também inclui fragmentos dos polinucleótidos da divulgação, como descrito noutro lado. Além disso, os polinucleótidos que codificam para

polinucleótidos de fusão, fragmentos Fab e outros derivados, como aqui descritos, são também contempladas pela divulgação.

Os polinucleótidos podem ser produzidos ou fabricados por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, se a sequência de nucleótidos do anticorpo é conhecida, um polinucleótido que codifica para o anticorpo pode ser montado a partir de oligonucleótidos sintetizados quimicamente (por exemplo, como descrito em Kutmeier *et al.*, *BioTechniques* 17: 242 (1994)), que, resumidamente, envolve a síntese de porções contendo oligonucleótidos que se sobrepõem da sequência que codifica para o anticorpo, hibridação e ligação destes oligonucleótidos, e depois amplificação dos oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, um polinucleótido que codifica para um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado pode ser gerado a partir do ácido nucleico de uma fonte adequada. Se um clone contendo um ácido nucleico que codifica para um anticorpo particular não está disponível, mas a sequência da molécula de anticorpo for conhecida, um ácido nucleico que codifica para o anticorpo pode ser quimicamente sintetizado ou obtido a partir de uma fonte adequada (por exemplo, uma biblioteca de cADN de anticorpos, ou uma biblioteca de cADN gerada a partir de, ou ácido nucleico, de preferência de poli-A+ARN, isolados a partir de, qualquer tecido ou células que expresse o anticorpo ou outro anticorpo Sp35, tais como células de hibridoma seleccionadas para expressar um anticorpo) por amplificação por PCR usando iniciadores sintéticos hibridáveis nas extremidades 3' e 5' da sequência ou por clonagem utilizando uma sonda oligonucleotídica específica para a sequência de gene particular a identificar, por

exemplo, um clone de cADN de uma biblioteca de cADN que codifica para o anticorpo ou outro anticorpo Sp35. Os ácidos nucleicos amplificados gerados por RCP podem ser então clonados em vectores de clonagem replicáveis usando qualquer método bem conhecido na técnica.

Uma vez determinada a sequência de nucleótidos e a correspondente sequência de aminoácidos do anticorpo Sp35, ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, a sua sequência de nucleótidos pode ser manipulada através de métodos bem conhecidos na técnica para a manipulação de sequências de nucleótidos, por exemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénese dirigida, PCR, etc. (ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.I. (1990) e Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Biologia Molecular*, John Wiley & Sons, N.I. (1998)), para gerar anticorpos que possuem uma sequência de aminoácidos diferente, por exemplo, para criar as substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos.

Um polinucleótido que codifica para um anticorpo Sp35, ou para um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado pode ser composto por qualquer polirribonucleótido ou polidesoxirribonucleótido, que pode ser ARN ou ADN não modificado ou ARN ou ADN modificado. Por exemplo, um polinucleótido que codifica para o anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado pode ser composto por um AND de cadeia simples e de cadeia dupla, ADN que é uma mistura de regiões de cadeia simples e de cadeia dupla, ARN que é uma mistura de regiões de cadeia simples e de cadeia dupla, moléculas híbridas compreendendo

ADN e ARN que podem ser de cadeia simples ou, mais tipicamente, de cadeia dupla ou uma mistura de regiões de cadeia simples e de cadeia dupla. Além disso, um polinucleótido que codifica para um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado pode ser composto por regiões de cadeia tripla compreendendo ARA ou ADN ou ambos ARN e ADN. Um polinucleótido que codifica para um anticorpo SP35, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado, podem também conter uma ou mais bases modificadas ou estruturas de ADN ou ARN modificadas para a estabilidade ou por outras razões. Bases “modificadas” incluem, por exemplo, bases tritiladas e bases incomuns, como a inosina. Uma variedade de modificações pode ser feita ao ADN e ARN; assim, “polinucleótido” abrange formas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente modificadas.

Um polinucleótido isolado que codifica para uma variante não natural de um polipéptido derivado de uma imunoglobulina (por exemplo, uma porção da cadeia pesada de imunoglobulina ou uma porção de cadeia leve), pode ser criado através da introdução de uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleótidos dentro a sequência de nucleótidos da imunoglobulina de tal forma que uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos são introduzidas na proteína codificada. As mutações podem ser introduzidas por meio de técnicas convencionais, tais como a mutagenese dirigida e mutagenese mediada por PCR. De preferência, substituições de aminoácidos conservativas são feitas num ou mais resíduos não essenciais de aminoácidos.

V. POLIPÉPTIDOS DO ANTICORPO Sp35

A presente divulgação é ainda dirigida a polipéptidos isolados que compõem anticorpos Sp35, seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados. Os anticorpos Sp35 da divulgação compreendem polipéptidos, por exemplo, as sequências de aminoácidos que codificam para as regiões de ligação a antígenos específicos para SP35 derivadas de moléculas de imunoglobulina. Um polipéptido ou sequência de aminoácido "derivado de" uma proteína designada refere-se à origem do polipéptido. Em certos casos, o polipéptido ou a sequência de aminoácido que é derivado de um polipéptido ou sequência de aminoácido de partida particular tem uma sequência de aminoácidos que é essencialmente idêntica à daquela da sequência de partida, ou de uma sua porção, em que a porção consiste em pelo menos 10-20 aminoácidos, pelo menos 20-30 aminoácidos, em pelo menos 30-50 aminoácidos, ou que seja de outro modo identificável por alguém competente na técnica como tendo a sua origem na sequência de partida.

Num exemplo, a divulgação proporciona um polipéptido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste numa região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (VH), em que pelo menos uma das CDRs da região variável da cadeia pesada ou em pelo menos duas das CDRs da região variável da cadeia pesada é pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica às sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 ou CDR3 da cadeia pesada de referência dos anticorpos Sp35 monoclonais aqui descritos. Alternativamente, as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 da VH são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 ou CDR3 da cadeia pesada de referência dos anticorpos Sp35 monoclonais aqui descritos. Assim, de acordo com este exemplo uma região da cadeia pesada variável da divulgação tem sequências de

polipéptidos CDR1, CDR2 e CDR3 relacionadas aos grupos apresentados na Tabela 4, *supra*. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo o polipéptido VH liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Noutro exemplo, a divulgação proporciona um polipéptido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste numa região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (VH), em que as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 possuem sequências de polipéptidos que são idênticas aos grupos CDR1, CDR2 e CDR3 apresentados na Tabela 4. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo o polipéptido VH liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação proporciona um polipéptideo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste numa região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (VH), em que pelo menos um dos CDRs da região variável de cadeia pesada ou pelo menos dois CDRs da região variável de cadeia pesada são pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos ao polinucleótido que codifica CDR1, CDR2 e CDR3 sequências de aminoácidos selecionados do grupo que consiste por VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica para a VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polipéptido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste num polipéptido VH que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntico a uma sequência polipeptídica VH de referência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380 e 384, 416 e 433 como apresentado na Tabela 6. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo o polipéptido VH liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polipéptido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste num polipéptido de VH seleccionado do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380, 384, 416 e 423 como apresentado na Tabela 6 e SEQ ID NO 435. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreendendo o polipéptido VH liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação inclui um polipéptideo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num polipéptido VH de pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idêntica à sequência de de polipéptido de VH seleccionada do grupo que consiste na cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica para a VH CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou

consistindo num ou mais de um dos polipéptidos VH acima descritos liga-se especificamente ou preferencialmente ao mesmo epitopo que um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo constituído por 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81 ou irá inibir competitivamente um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo num ou mais dos polipéptidos VH acima descritos liga-se especificamente ou preferencialmente a um polipéptido Sp35 ou fragmento do mesmo, ou a um polipéptido Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (K_D) não superior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

Noutro exemplo, a divulgação proporciona um polipéptido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste numa região variável da cadeia leve de imunoglobulina (VL), onde pelo menos uma das CDRs da região

variável da cadeia leve ou pelo menos duas das CDRs da região variável da cadeia leve é pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica às sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 ou CDR3 de cadeia pesada de referência de anticorpos Sp35 monoclonais aqui descritos. Alternativamente, as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de VL são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas idêntica às sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 ou CDR3 de cadeia leve de referência de anticorpos Sp35 monoclonais aqui descritos. Assim, de acordo com este exemplo, uma região variável de cadeia leve da divulgação tem sequências de polipéptidos CDR1, CDR2 e CDR3 relacionadas com os polipéptidos apresentados na Tabela 5, *supra*. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo o polipéptido VL liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Noutro exemplo, a presente divulgação proporciona um polipéptido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste numa região variável de cadeia leve de imunoglobulina (VL) na qual as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 possuem sequências de polipéptidos que são idênticas aos grupos CDR1, CDR2 e CDR3 apresentados na Tabela 5. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo o polipéptido VL liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação proporciona um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num ácido nucleico que codifica para uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (VL), em que pelo menos uma das CDRs da região variável de cadeia leve ou pelo menos duas das CDRs da região

variável de cadeia leve são pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos ao polinucleótido que codifica a VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) ou o polinucleótido que codifica para a VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Noutro exemplo, a divulgação inclui um polipéptido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste num polipéptido de VL que é pelo menos, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a uma sequência polipeptídica VL de referência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385, 417 e 434 apresentadas na Tabela 8. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo o polipéptido VL liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Noutro exemplo, a presente divulgação inclui um polipéptido isolado que compreende, que consiste essencialmente em, ou que consiste num polipéptido de VL seleccionado de entre o grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385, 417 e 434 apresentadas na Tabela 8. Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo o polipéptido VL liga-se especificamente ou preferencialmente a Sp35.

Num exemplo adicional da divulgação da presente divulgação inclui um polinucleótido isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consiste num polipéptido VL de pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 % idênticos à sequência de polipéptido VL de referência seleccionada do grupo que

consiste em VL da cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) e a cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Nalguns exemplos, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente de, um ou mais dos polipéptidos descritos acima de VL liga-se preferencialmente ou especificamente ao mesmo epitopo que um anticorpo monoclonal seleccionado a partir do grupo consistindo em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), e 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3b5.2 e Li81 ou irá inibir competitivamente um tal anticorpo monoclonal de se ligar aos Sp35.

Nalguns exemplos, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo num ou mais de um dos polipéptidos VL acima descritos liga-se especificamente ou preferencialmente a um polipéptido Sp35 ou a um seu fragmento, ou a um polipéptido variante SP35, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (K_D) não superior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M,

10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

Noutros exemplos, um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio compreende, consiste essencialmente de ou consiste num polipéptido VH, tal como apresentado na Tabela 6, e num polipéptido VL, como apresentado na Tabela 8, seleccionado de entre o grupo que consiste em:

- i) SEQ ID NO: 170 e SEQ ID NO: 283;
- ii) SEQ ID NO: 171 e SEQ ID NO: 284;
- iii) SEQ ID NO: 172 e SEQ ID NO: 285;
- iv) SEQ ID NO: 172 e SEQ ID NO: 286;
- v) SEQ ID NO: 158 e SEQ ID NO: 273;
- vi) SEQ ID NO: 159 e SEQ ID NO: 274;
- vii) SEQ ID NO: 160 e SEQ ID NO: 275;
- viii) SEQ ID NO: 161 e SEQ ID NO: 276;
- ix) SEQ ID NO: 163 e SEQ ID NO: 277;
- x) SEQ ID NO: 164 e SEQ ID NO: 278;
- xi) SEQ ID NO: 165 e SEQ ID NO: 279;
- xii) SEQ ID NO: 166 e SEQ ID NO: 280;
- xiii) SEQ ID NO: 167 e SEQ ID NO: 281;
- xiv) SEQ ID NO: 168 e SEQ ID NO: 282;
- xv) SEQ ID NO: 372 e SEQ ID NO: 373;
- xvi) SEQ ID NO: 376 e SEQ ID NO: 377;
- xvii) SEQ ID NO: 380 e SEQ ID NO: 381;
- xviii) SEQ ID NO: 384 e SEQ ID NO: 385,
- xix) SEQ ID NO: 416 e SEQ ID NO: 417;
- xx) SEQ ID NO: 433 e SEQ ID NO: 434;
- xx1) SEQ ID NO: 435 e SEQ ID NO: 434.

Noutros exemplos, um anticorpo um fragmento de ligação de antigénio do mesmo compreende essencialmente de ou consiste em um oplipéptido VH e um polipéptido VL seleccionado do grupo consistindo no polipéptido VL e polipéptido VH produzido por

hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito ATCC PTA-8106) polipéptido VL e polipéptido VH produzido pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação Depósito ATCC PTA - 8107).

Qualquer um dos polipéptidos acima descritos pode ainda incluir polipéptidos adicionais, por exemplo, um péptido sinal para dirigir a secreção do polipéptido codificado, regiões constantes do anticorpo, tal como aqui descrito, ou outros polipéptidos heterólogos tal como aqui descrito. Além disso, os polipéptidos da divulgação incluem fragmentos de polipéptido, tal como descrito noutro lado. Além disso, os polipéptidos da divulgação incluem a fusão de polipéptidos, fragmentos Fab e outros derivados, como aqui descrito.

Ainda, tal como descrito em mais detalhe neste documento, a divulgação inclui composições compreendendo os polipéptidos acima descritos.

Será também entendido por um perito na técnica que polipéptidos do anticorpo Sp35 tal como aqui descritos podem ser modificados de tal modo que variam na sequência de aminoácidos relativamente ao polipéptido que se liga que ocorre naturalmente a partir do qual foram derivadas. Por exemplo, um polipéptido ou sequência de aminoácido derivada de uma proteína designada pode ser semelhante, por exemplo, ter uma determinada percentagem de identidade relativamente à sequência de partida, por exemplo, pode ser 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica relativamente à sequência de partida.

Além disso, as substituições, deleções ou inserções de nucleótidos ou de aminoácidos que conduzem a substituições ou

alterações conservativas em regiões de aminoácidos “não essenciais” podem ser realizadas. Por exemplo, um polipéptido ou sequência de aminoácido derivada de uma proteína designada, pode ser idêntica à sequência de partida com a exceção de uma ou mais substituições, inserções ou deleções individuais de aminoácidos, por exemplo, substituições, inserções ou deleções de um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, quinze, vinte ou mais aminoácidos individuais. Nalguns exemplos, uma sequência de polipéptido ou aminoácido derivado de uma proteína designada tem uma a cinco, uma a dez, uma a quinze, ou uma a vinte substituições, inserções ou deleções de aminoácidos individuais em relação à sequência de partida.

Determinados polipéptidos do anticorpo Sp35 da presente divulgação compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem numa sequência de aminoácidos derivada de uma sequência de aminoácidos humana. No entanto, certos polipéptidos do anticorpo Sp35 compreendem um ou mais aminoácidos contíguos derivados de outras espécies de mamíferos. Por exemplo, um anticorpo Sp35 da divulgação pode incluir uma porção de cadeia pesada, a porção “hinge”, ou a região de ligação ao antigénio de primata. Em outro exemplo, um ou mais aminoácidos derivados de murino podem estar presentes num polipéptido de anticorpo não murino, por exemplo, num local de ligação ao antigénio de um anticorpo SP35. Em certas aplicações terapêuticas, os anticorpos específicos para Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou análogos são concebidos de modo a não serem imunogénicos no animal ao qual o anticorpo é administrado.

Nalguns exemplos, um polipéptido do anticorpo Sp35 compreende uma sequência de aminoácidos ou uma ou mais porções que não são normalmente associadas com um anticorpo. Exemplos de modificações são descritos em mais detalhe abaixo. Por exemplo, um fragmento de anticorpo fv de cadeia simples da divulgação pode compreender uma sequência ligante flexível, ou pode ser modificado para adicionar uma porção funcional (por exemplo, PEG, um fármaco, uma toxina, ou uma marcação).

Um polipéptido do anticorpo Sp35 pode compreender, consistir essencialmente em, ou consistir numa proteína de fusão. As proteínas de fusão são as moléculas quiméricas que compreendem, por exemplo, um domínio de ligação ao antigénio de imunoglobulina com pelo menos um local de ligação ao alvo, e pelo menos uma porção heteróloga, ou seja, uma porção com a qual não está naturalmente ligada na natureza. As sequências de aminoácidos podem normalmente existir em proteínas separadas que são reunidas no polipéptido de fusão ou podem existir normalmente na mesma proteína mas são colocados num novo arranjo no polipéptido de fusão. As proteínas de fusão podem ser criadas, por exemplo, por síntese química, ou através da criação e da tradução de um polinucleótido no qual as regiões peptídicas são codificadas na relação desejada.

O termo "heterólogo", quando aplicado a um polinucleótido ou um polipéptido, significa que o polinucleótido ou polipéptido é derivado de uma entidade distinta da do resto da entidade em relação à qual está a ser comparada. Por exemplo, tal como é aqui utilizado, um "polipéptido heterólogo" para ser fundido a um anticorpo Sp35, ou a um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou análogo é derivado de um polipéptido não imunoglobulina da mesma espécie, ou de um

polipéptido imunoglobulina ou não imunoglobulina de uma espécie diferente.

Uma “substituição de aminoácidos conservativa” é aquela em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral semelhante. As famílias de resíduos de aminoácidos possuindo cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares sem carga (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um resíduo de aminoácido não essencial num polipéptido de imunoglobulina é de preferência substituído por um outro resíduo de aminoácido a partir da mesma família de cadeias laterais. Noutro exemplo, uma sequência de aminoácidos pode ser substituída por sequência estruturalmente semelhante que difere na ordem e/ou na composição dos membros da família de cadeias laterais.

Alternativamente, noutro exemplo, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou parte da sequência codificante para a imunoglobulina, tal como por mutagénesse de saturação, e os mutantes resultantes podem ser incorporados em anticorpos Sp35 para utilização nos métodos de diagnóstico e de tratamento aqui descritos e pesquisados quanto à sua capacidade para se ligarem ao antigénio desejado, por exemplo, Sp35.

VI. PROTEÍNAS DE FUSÃO E CONJUGADOS DE ANTICORPOS

Tal como aqui discutido em mais detalhe noutro lado, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação podem ainda ser recombinantemente fundidos a um polipéptido heterólogo na extremidade N ou C ou quimicamente conjugados (incluindo conjugações covalentes e não covalentes) a polipéptidos ou outras composições. Por exemplo, anticorpos Sp35 específicos para Sp35 podem ser recombinantemente fundidos ou conjugados a moléculas úteis como marcadores em ensaios de detecção e moléculas efectoras, tais como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionuclídeos, ou toxinas. Ver, por exemplo, as publicações PCT WO 92/08495, WO 91/14438, WO 89/12624, Patente E.U.A. No. 5,314,995 e EP 396,387.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados, da divulgação incluem derivados que são modificados, isto é, por ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo, tal que a ligação covalente não impede a ligação do anticorpo a Sp35. Por exemplo, mas não como limitação, os derivados do anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, por exemplo, por glicosilação, acetilação, peguilação, fosfilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos protectores/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc. Qualquer das numerosas modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não se limitando a clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Além disso, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser compostos por aminoácidos ligados uns aos outros por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, isto é, isósteros peptídicos, e podem conter outros aminoácidos para além dos 20 aminoácidos codificados por genes. Os anticorpos específicos para Sp35 podem ser modificados por processos naturais, tal como processamento pós-tradução, ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas na técnica. Tais modificações estão bem descritas em textos básicos e em monografias mais pormenorizadas, bem como numa volumosa literatura de investigação. As modificações podem ocorrer em qualquer parte do anticorpo específico para Sp35, incluindo o esqueleto peptídico, as cadeias laterais de aminoácidos e as extremidades amino ou carboxilo, ou em porções, tais como hidratos de carbono. Será apreciado que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo ou em graus variáveis em vários locais num determinado anticorpo específico para SP35. Além disso, um determinado anticorpo específico para SP35 pode conter muitos tipos de modificações. Anticorpos Sp35 específicos podem ser ramificados, por exemplo, como resultado de ubiquitinação, e podem ser cíclicos, com ou sem ramificação. Anticorpos específicos para Sp35 cíclicos, ramificados, cíclicos e ramificados pode resultar de processos naturais de pós-tradução ou podem ser produzidos por métodos sintéticos. As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma porção heme, ligação covalente de um nucleótido ou derivado de nucleótido, ligação covalente de um lípido ou derivado lipídico, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligações dissulfureto, desmetilação, formação de ligações-cruzadas covalentes,

formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristoilação, oxidação, peguilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, adição de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferência, como arginilação, e ubiquitinação. (Ver, por exemplo, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nova Iorque 2ª Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nova Iorque, págs. 1-12 (1983); Seifter et al., *Meth Enzymol* 182: 626-646 (1990); Rattan et al., *Ann NY Acad Sci* 663: 48-62 (1992)).

A presente divulgação também proporciona proteínas de fusão compreendendo um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, e um polipéptido heterólogo. O polipéptido heterólogo ao qual o anticorpo é fundido pode ser útil para a função ou é útil para alvejar as células que expressam o polipéptido Sp35. Num exemplo, uma proteína de fusão da divulgação compreende, consiste essencialmente de, ou consiste num polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais das regiões V_H de um anticorpo da divulgação, ou a sequência de aminoácidos de qualquer uma ou mais das regiões V_L de um anticorpo da divulgação, ou seus fragmentos ou variantes, e uma sequência polipeptídica heteróloga. Noutro exemplo, uma proteína de fusão para utilização nos métodos de diagnóstico e de tratamento aqui divulgados compreende, consiste essencialmente em, ou consiste num polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas, três das CDRs de V_H de um anticorpo específico para Sp35, ou seus os fragmentos, variantes ou derivados, ou a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas, três das CDRs de V_L de um

anticorpo específico para SP35, ou seus fragmentos, variantes ou derivados, e uma sequência de polipéptido heterólogo. Num exemplo, a proteína de fusão compreende um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de uma CDR3 de V_H de um anticorpo específico para Sp35 da presente divulgação, ou um seu fragmento, derivado ou variante, e uma sequência de polipéptido heterólogo, cuja proteína de fusão se liga especificamente a, pelo menos, um epítipo de Sp35. Noutro exemplo, uma proteína de fusão compreende um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de pelo menos uma região V_H de um anticorpo específico para Sp35 da divulgação e a sequência de aminoácidos de pelo menos uma região V_L de um anticorpo específico de Sp35 da divulgação ou seus fragmentos, derivados ou variantes, e uma sequência de polipéptido heterólogo. De preferência, as regiões V_H e V_L da proteína de fusão correspondem a uma única fonte de anticorpo (ou fragmento scFv ou Fab) que se liga especificamente a, pelo menos, um epítipo de Sp35. Ainda noutro exemplo, uma proteína de fusão para utilização nos métodos de diagnóstico e de tratamento aqui descritos compreende um polipéptido tendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas, três ou mais das CDR de V_H de um anticorpo específico para Sp35 e a sequência de aminoácidos de qualquer uma, duas, três ou mais das CDRs de V_L de um anticorpo específico para Sp35, ou seus fragmentos ou variantes, e uma sequência de polipéptido heterólogo. De preferência, duas, três, quatro, cinco, seis, ou mais de V_H CDR (s) ou V_L CDR (s) correspondem a uma única fonte de anticorpo (ou fragmento scFv ou Fab) da divulgação. As moléculas de ácido nucleico que codificam para estas proteínas de fusão também são abrangidos pela divulgação.

Exemplos de proteínas de fusão reportadas na literatura incluem fusões do receptor de células T (Gascoigne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2936-2940 (1987)); CD4 (Capon

et al., *Nature* 337: 525-531 (1989); Traunecker *et al.*, *Nature* 339: 68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, *ADN Cell Biol. USA* 9: 347-353 (1990); e Byrn *et al.*, *Nature* 344: 667-670 (1990)); L-selectina (receptor de "homing") (Watson *et al.*, *J. Cell. Biol.* 110: 2221-2229 (1990); e Watson *et al.*, *Nature* 349: 164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*, *Cell* 61: 1303-1313 (1990)); CD28 e B7 (Linsley *et al.*, *J. Exp. Med.* 173: 721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, *J. Exp. Med.* 174: 561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, *Cell* 66: 1133-1144 (1991)); receptor de TNF (Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 27: 2883-2886 (1991); e Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.* 174: 1483-1489 (1991)); e receptor de IgE (Ridgway e Gorman, *J. Cell. Biol. Vol. 115*, Resumo No. 1448 (1991)).

Nalguns exemplos, anticorpos Sp35, fragmentos de anticorpos, seus derivados e variantes compreendem ainda uma porção de direccionamento. Porções de direccionamento incluem uma proteína ou um péptido que se dirige para a localização de uma determinada parte do corpo, por exemplo, o cérebro ou compartimentos no seu interior. Nalguns exemplos, anticorpos Sp35, fragmentos de anticorpos, seus derivados e variantes, são ligados ou fundidos a uma porção de direccionamento para o cérebro. As porções de direccionamento para o cérebro de estão ligadas covalentemente (por exemplo, fusão por tradução directa, ou por ligação química, quer directamente ou através de uma molécula espaçadora, a qual pode ser opcionalmente clivável) ou não covalentemente (por exemplo, através de interacções reversíveis, tais como avidina, biotina, proteína A, IgG, etc.). Noutros exemplos, os anticorpos Sp35, os fragmentos de anticorpos, seus derivados e variantes estão ligados a uma ou mais porções de direccionamento para o cérebro. Em exemplos adicionais, a porção de direccionamento

cérebro está ligada a uma pluralidade de anticorpos Sp35, fragmentos de anticorpos, seus derivados e variantes.

Uma porção de direcionamento para o cérebro associada a um anticorpo Sp35, um fragmento de anticorpo, ou seu derivado ou variante aumenta a administração de tais anticorpos Sp35, fragmentos de anticorpos, seus derivados e variantes ao cérebro. Foram descritos uma série de polipéptidos que, quando fundidos a uma proteína ou agente terapêutico, administram a proteína ou agente terapêutico através da barreira hematoencefálica (BBB). Exemplos não limitativos incluem o anticorpo de domínio único FC5 (Abulrob *et al.* (2005) *J. Neurochem.* 95, 1201-1214); mAB 83-14, um anticorpo monoclonal contra o receptor de insulina humana (Pardridge *et al.* (1995) *Pharmacol. Res.* 12, 807-816); os péptidos B2, B6 e B8 que se ligam ao receptor de transferrina humana (hTfR) (Xia *et al.* (2000) *J. Virol.* 74, 11359-11366); o anticorpo monoclonal OX26 para o receptor de transferrina (Pardridge *et al.* (1991) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 66-70); e SEQ ID NOs: 1-18 da Patente E.U.A. No. 6,306,365.

A administração aumentada ao cérebro de um anticorpo SP35, fragmento de anticorpo, seu derivado ou variante, é determinada por uma série de meios bem estabelecidos na técnica. Por exemplo, a administração a um animal de um anticorpo Sp35, fragmento de anticorpo, seu derivado e variante, fragmento de anticorpo, derivado e sua variante marcado radioativamente, com fluorescência ou enzimaticamente ligado a uma porção de direcionamento para o cérebro; determinar a localização no cérebro; e comparar a localização com um anticorpo Sp35, fragmento de anticorpo, seu derivado e variante, fragmento de anticorpo, derivado e sua variante marcado radioativamente, com fluorescência ou enzimaticamente equivalente que não está associada a uma

porção de direccionamento para o cérebro. Outros meios para determinar um maior direccionamento são descritos nas referências acima.

Tal como aqui discutido noutro local, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser fundidos com polipéptidos heterólogos, para aumentar a meia-vida *in vivo* dos polipéptidos ou para utilização em imunoensaios usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, num exemplo, o PEG pode ser conjugado aos anticorpos Sp35 da divulgação para aumentar a sua meia-vida *in vivo*. Leong, S.R., et al., *Cytokine* 16: 106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54: 531 (2002); ou Weir et al., *Biochem. Soc. Transactions* 30: 512 (2002).

Além disso, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser fundidos com sequências de marcador, tal como um péptido para facilitar a sua purificação ou detecção. Em exemplos preferidos, a sequência de aminoácidos marcadora é um péptido hexa-histidina, tal como a marcação fornecida num vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Califórnia, 91311), entre outros, muitos dos quais são comercialmente disponíveis. Conforme descrito em Gentz et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 (1989), por exemplo, a hexa-histidina proporciona a purificação conveniente da proteína de fusão. Outras marcações de péptidos úteis para a purificação incluem, mas não estão limitados a, a marcação "HA", que corresponde a um epitopo derivado da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., *Cell* 37:161 (1984)) e a marcação "flag".

Proteínas de fusão podem ser preparadas usando métodos que são bem conhecidos na técnica (ver por exemplo Patentes dos E.U.A. Nos. 5,116,964 e 5,225,538). O local preciso em que a fusão é feita pode ser seleccionado empiricamente para optimizar as características de secreção ou de ligação da proteína de fusão. O ADN que codifica para a proteína de fusão é então transfectado para uma célula hospedeira para a expressão.

Anticorpos Sp35 ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação podem ser utilizados na forma não conjugada ou podem ser conjugados com, pelo menos, um de uma variedade de moléculas, por exemplo, para melhorar as propriedades terapêuticas da molécula, para facilitar a detecção do alvo, ou para imagiologia ou terapia do paciente. Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser marcados ou conjugados, quer antes ou depois da purificação, quando a purificação é realizada.

Em particular, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser conjugados com agentes terapêuticos, pró-drogas, péptidos, proteínas, enzimas, lípidos, vírus, modificadores da resposta biológica, agentes farmacêuticos ou PEG.

Os especialistas na técnica apreciarão que os conjugados podem também ser montados utilizando uma variedade de técnicas, dependendo do agente seleccionado para ser conjugado. Por exemplo, conjugados com biotina são preparados, por exemplo, por reacção de um polipéptido de ligação com um éster activado da biotina tal como o éster de

N-hidroxisuccinimida biotina. Do mesmo modo, conjugados com um marcador fluorescente podem ser preparados na presença de um agente de acoplamento, por exemplo, aqueles aqui listados, ou por reacção com um isotiocianato, de preferência fluoresceína-isotiocianato. Os conjugados dos anticorpos SP35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação são preparados de uma maneira análoga.

A presente divulgação engloba ainda anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação conjugados com um agente de diagnóstico ou terapêutico. Os anticorpos SP35 podem ser usados para diagnóstico para, por exemplo, monitorizar o desenvolvimento ou a progressão de uma doença neurológica, como parte de um procedimento de ensaio clínico para, por exemplo, determinar a eficácia de um dado tratamento e/ou regime de prevenção. A detecção pode ser facilitada pelo acoplamento do anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, a uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos de prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioactivos, metais emissores de positrões utilizando várias tomografias de emissão de positrões, e iões metálicos paramagnéticos não radioactivos. Ver, por exemplo, a Patente dos E.U.A. No. 4,741,900 para iões metálicos que podem ser conjugados com anticorpos para utilização como agentes de diagnóstico de acordo com a presente divulgação. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona,

fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui o luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem a luciferase, a luciferina, e a aequorina, e exemplos de material radioactivo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In ou ^{99}Tc .

Um anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado pode também ser marcado de forma detectável acoplando-o a um composto quimioluminescente. A presença do anticorpo quimioluminiscente Sp35 marcado é então determinada detectando a presença da luminescência que surge durante o decurso de uma reacção química. Exemplos de compostos de marcação quimioluminescentes particularmente úteis são o luminol, isoluminol, éster de acridínio teromático, imidazole, sal acridínio e éster de oxalato.

Uma das formas na qual um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado podem ser marcados de forma detectável é ligando-o a uma enzima e utilizar o produto ligado num imunoensaio enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., *Diagnostic Horizons* 2: 1-7 (1978)); Voller et al., *J. Clin. Pathol.* 31: 507-520 (1978); Butler, J. E., *Meth. Enzymol.* 73: 482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. et al., (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kaku Shoin, Tóquio (1981). A enzima, que está ligada ao anticorpo Sp35 irá reagir com um substrato apropriado, de preferência um substrato cromogénico, de forma a produzir uma porção química que pode ser detectada, por exemplo, por meios espectrofotométricos, fluorimétricos ou por visuais. As enzimas que podem ser utilizadas para marcar o anticorpo de

forma detectável incluem, mas não estão limitados a, malato desidrogenase, nuclease de estafilococo, isomerase de delta-5-esteróide, a levedura da álcool desidrogenase, a alfa-glicerofosfato, desidrogenase, triose fosfato isomerase, peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-fosfato desidrogenase, glucoamilase e acetilcolinesterase. Além disso, a detecção pode ser conseguida por métodos colorimétricos que utilizam um substrato cromogénico para a enzima. A detecção pode também ser conseguida por comparação visual da extensão da reacção enzimática de um substrato em comparação com padrões preparados de modo semelhante.

A detecção pode também ser conseguida utilizando qualquer um de uma variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, por marcação radioactiva do anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, é possível detectar o anticorpo através da utilização de um radioimunoensaio (RIA) (ver, por exemplo, Weintraub, B., *Principles de Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, (Março, 1986)). O isótopo radioactivo pode ser detectado por meios incluindo, mas não limitado a, um contador de raios gama, um contador de cintilação, ou auto-radiografia.

Um anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado pode também ser marcado de forma detectável utilizando metais emissores de fluorescência, tais como ^{152}Eu , ou outros da série dos lantanídeos. Estes metais podem ser ligados ao anticorpo utilizando grupos quelantes de metais tais como o ácido dietilenotriaminapentacético (DTPA) ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

Técnicas para conjugar várias porções de um anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação de antígeno, variante ou derivado são bem conhecidas, ver, por exemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers de Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective of The Therapeutic Use de Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), e Thorpe et al., "The Preparation e Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982).

VII. EXPRESSÃO DE POLIPÉPTIDOS DE ANTICORPOS

Como é bem conhecido, o RNA pode ser isolado a partir das células de hibridoma originais ou de outras células transformadas por meio de técnicas convencionais, tais como extracção de isotiocianato de guanidínio e precipitação seguida por centrifugação ou cromatografia. Quando desejável, o mARN pode ser isolado a partir do ARN total por meio de técnicas convencionais, tais como cromatografia em oligo dT celulose. Técnicas adequadas são conhecidas na técnica.

Num exemplo, os cADNs que codificam para as cadeias leve e pesada do anticorpo podem preparados, simultaneamente ou separadamente, utilizando transcriptase reversa e polimerase

de ADN de acordo com métodos bem conhecidos. A reacção de PCR pode ser iniciada por iniciadores da região constante de consenso ou por mais iniciadores específicos com base no ADN nas sequências de aminoácidos publicadas da cadeia pesada e leve. Como discutido acima, pode-se também usar PCR para isolar clones de ADN que codificam para as cadeias leve e pesada do anticorpo. Neste caso, as bibliotecas podem ser rastreadas por iniciadores de consenso ou sondas homólogas maiores, tais como sondas da região constante de rato.

O ADN, tipicamente ADN plasmídico, pode ser isolado a partir das células utilizando técnicas conhecidas na técnica, com mapeamento de restrição e sequenciação de acordo com técnicas bem conhecidas convencionais apresentadas em detalhe, por exemplo, nas referências anteriores relativas a técnicas de ADN recombinante. Claro que, o ADN pode ser sintético em qualquer momento durante o processo de isolamento ou a análise subsequente.

Após a manipulação do material genético isolado para fornecer anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação, os polinucleótidos que codificam para os anticorpos Sp35 são tipicamente inseridos num vector de expressão para a introdução em células de um hospedeiro que podem ser utilizadas para produzir a quantidade desejada de anticorpo Sp35.

A expressão recombinante de um anticorpo, ou de um seu fragmento, derivado ou análogo, por exemplo, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo que se liga a uma molécula alvo aqui descrito, por exemplo, Sp35, requer a construção de um vector de expressão que contenha um polinucleótido que

codifica para o anticorpo. Uma vez obtido um polinucleótido que codifica para uma molécula de anticorpo de uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou uma sua porção (de preferência contendo o domínio variável da cadeia pesada ou leve), da divulgação, o vector para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido por tecnologia de ADN recombinante usando técnicas bem conhecidas na técnica. Assim, os métodos para a preparação de uma proteína pela expressão de um polinucleótido contendo uma sequência de nucleótidos que codifica para o anticorpo são aqui descritos. Os métodos que são bem conhecidos dos peritos na técnica podem ser usados para construir vectores de expressão contendo sequências que codificam para o anticorpo e sinais de controlo da transcrição e da tradução apropriados. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntese, e recombinação genética *in vivo*. A divulgação, assim, proporciona vectores replicáveis que compreendem uma sequência de nucleótidos que codifica para uma molécula de anticorpo da divulgação, ou uma sua cadeia leve ou pesada, ou um domínio variável de cadeia leve ou pesada, operacionalmente ligada a um promotor. Tais vectores podem incluir a sequência de nucleótidos que codifica para a região constante da molécula de anticorpo (ver, por exemplo, a publicação PCT WO 86/05807, Publicação PCT WO 89/01036, e Patente dos E.U.A. No. 5,122,464) e o domínio variável do anticorpo pode ser clonado num tal vector de expressão da totalidade da cadeia pesada ou leve.

A célula hospedeira pode ser co-transfectada com dois vectores da expressão, o primeiro vector codifica um polipéptido derivado de cadeia pesada e o segundo vector que codifica para um polipéptido derivado da cadeia leve. Os dois vectores podem conter marcadores seleccionáveis idênticos que permitem uma expressão igual dos polipéptidos das cadeias

pesada e leve. Alternativamente, um único vector pode ser usado que codifica para ambos os polipéptidos de cadeia pesadas e leves. Em tais situações, a cadeia leve é vantajosamente colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso de cadeia pesada sem tóxico (Proudfoot, *Nature* 322: 52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2197 (1980)). As sequências codificantes para as cadeias pesada e leve podem compreender cADN ou ADN genómico.

O termo "vector" ou "vector de expressão" é aqui utilizado para significar vectores utilizados em conformidade com a presente divulgação, como um veículo para introduzir no interior e expressar um gene desejado numa célula hospedeira. Como é conhecido dos peritos na técnica, tais vectores podem ser facilmente seleccionados de entre o grupo que consiste em plasmídeos, fagos, vírus e retrovírus. Em geral, os vectores compatíveis com a presente divulgação irão compreender um marcador de selecção, os locais de restrição adequados para facilitar a clonagem do gene desejado e a capacidade de entrar e/ou replicar-se em células eucarióticas ou procarióticas.

Para os fins da divulgação, podem ser empregues vários sistemas de vectores de expressão. Por exemplo, uma classe de vector utiliza elementos de ADN que derivam de vírus animais tais como vírus do papiloma bovino, vírus polioma, adenovírus, vírus vaccinia, baculovírus, retrovírus (RSV, MMTV ou MoMLV) ou vírus SV40. Outros envolvem a utilização de sistemas policistronicos com locais de ligação ao ribossoma internos. Além disso, as células que tenham integrado o ADN nos seus cromossomas podem ser seleccionadas através da introdução de um ou mais marcadores que permitem a selecção de células hospedeiras transfectadas. O marcador pode

proporcionar prototrofia a um hospedeiro auxotrófico, resistência a biocidas (por exemplo, antibióticos) ou resistência a metais pesados, tais como o cobre. O gene marcador seleccionável pode ser ou directamente ligado às sequências de ADN a serem expressas, ou introduzido na mesma célula por co-transformação. Elementos adicionais também podem ser necessários para a síntese óptima de mRNA. Estes elementos podem incluir sequências de sinal, sinais de "splicing", assim como promotores da transcrição, potenciadores e sinais de terminação.

Em exemplos particularmente preferidos, os genes das regiões variáveis clonadas são inseridos num vector de expressão, em conjunto com os genes da região constante da cadeia pesada e leve (de preferência humanos) sintéticos, como discutido acima. Num exemplo, isto é conseguido utilizando um vector de expressão proprietário da Biogen IDEC, Inc., referido como NEOSPLA (Patente dos E.U.A. 6,159,730). Este vector contém o promotor/potenciador de citomegalovírus, o promotor principal beta globina de rato, a origem de replicação SV40, a sequência de poliadenilação da hormona de crescimento bovina, o exão 1 e exão 2 da neomicina fosfotransferase, o gene da di-hidrofolato redutase e a sequência líder. Verificou-se que este vector resultava num nível muito elevado de expressão de anticorpos mediante a incorporação de genes da região variável e constante, a transfecção em células CHO, seguido pela selecção em meio contendo G418 e amplificação de metotrexato. Claro que, qualquer vector de expressão que é capaz de induzir a expressão em células eucarióticas pode ser utilizado na presente divulgação. Exemplos de vectores adequados incluem, mas não estão limitados a plasmídeos pcADN3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 e pZeoSV2 (disponível de Invitrogen, San Diego, CA), e o plasmídeo pCI

(disponível da Promega, Madison, WI). Em geral, o rastreamento de grandes números de células transformadas para aquelas que expressam níveis apropriadamente elevados de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina é uma experimentação de rotina, que pode ser realizada, por exemplo, por sistemas robóticos. Sistemas de vectores também são ensinados na Patente dos E.U.A. Nos. 5,736,137 e 5,658,570. Este sistema proporciona níveis elevados de expressão, por exemplo, > 30 pg/célula/dia. Outros exemplos de sistemas de vectores são divulgados por exemplo, na Patente dos E.U.A. 6,413,777.

Noutros exemplos preferidos, os anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser expressos utilizando construções policistronicas, tais como as revelados na Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 2003-0157641 A1, depositado a 18 de Novembro de 2002. Nestes novos sistemas de expressão, vários produtos de gene de interesse, tais como as cadeias pesada e leve de anticorpos podem ser produzidos a partir de uma única construção policistronica. Estes sistemas vantajosamente utilizam um local de entrada de ribossoma interno (IRES) para fornecer níveis relativamente elevados de anticorpos Sp35, por exemplo, polipéptidos de ligação, por exemplo, anticorpos específicos de Sp35 ou seus fragmentos destes imuno-específicos em células hospedeiras eucarióticas. Sequências IRES compatíveis são divulgadas na Patente dos E.U.A. No. 6,193,980. Os peritos na técnica irão apreciar que tais sistemas de expressão podem ser utilizados para produzir de forma eficaz toda a gama de anticorpos Sp35 divulgados no presente pedido de patente.

De modo mais geral, uma vez preparado o vector ou sequência de ADN que codifica para uma subunidade monomérica do

anticorpo Sp35, o vector de expressão pode ser introduzido numa célula hospedeira apropriada. A introdução do plasmídeo na célula hospedeira pode ser realizada por várias técnicas bem conhecidas dos peritos na técnica. Estas incluem, mas não estão limitadas a, transfecção (incluindo electroforese e electroporação), fusão de protoplastos, precipitação com fosfato de cálcio, fusão celular com ADN em envelope, microinjecção e infecção com o vírus intacto. Ver, Ridgway, A. A. G. *"Mammalian Expression Vectors"* Vectors, Rodriguez e Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., Capítulo 24.2, pp. 470-472 (1988). Tipicamente, a introdução plasmídeo no hospedeiro é através de electroporação. As células hospedeiras com a construção de expressão são cultivadas sob condições adequadas para a produção das cadeias leves e cadeias pesadas, e testadas para a síntese da proteína de cadeia pesada e/ou leve. Exemplos de técnicas de ensaio incluem ensaio de imunossorção associado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) ou análise de selecção de células activado por fluorescência (FACS), imuno-histoquímica e semelhantes.

O vector de expressão é transferido para uma célula hospedeira através de técnicas convencionais e as células transfectadas são então cultivadas através de técnicas convencionais para produzir um corpo para utilização nos métodos aqui descritos. Assim, a divulgação inclui células hospedeiras que contêm um polinucleótido que codifica um anticorpo da divulgação, ou para uma cadeia pesada ou leve do mesmo, ligado operativamente a um promotor heterólogo. Em exemplos preferidos para a expressão de anticorpos de cadeia dupla, vectores que codificam para ambas as cadeias pesada e leve podem ser co-expressos na célula hospedeira para a expressão da totalidade da molécula de imunoglobulina, tal como detalhado abaixo.

Tal como aqui utilizado, "células hospedeiras" refere-se a células que contêm vectores construídos utilizando técnicas de ADN recombinante e que codificam para pelo menos um gene heterólogo. Nas descrições de processos para o isolamento de anticorpos a partir de hospedeiros recombinantes, os termos "célula" e "cultura de células" são utilizados indiferentemente para indicar a fonte de anticorpo a menos que seja claramente indicado em contrário. Noutras palavras, a recuperação do polipéptido a partir das "células" pode significar a partir de células inteiras centrifugadas, ou a partir da cultura de células contendo tanto o meio como as células em suspensão.

Pode ser usada uma variedade de sistemas hospedeiro-vetor de expressão para expressar as moléculas de anticorpo para utilização nos métodos aqui descritos. Tais sistemas hospedeiro-expressão representam veículos através dos quais as sequências de codificação de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfectadas com as sequências de codificação nucleotídicas apropriadas, expressar uma molécula de anticorpo da divulgação *in situ*. Estas incluem, mas não estão limitadas a, microorganismos, tais como bactérias (por exemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas com vectores de expressão recombinante de ADN de bacteriófago, ADN plasmídico de ADN de cosmídeos contendo as sequências de codificação de anticorpo; levedura (por exemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada com vectores de expressão de leveduras recombinantes contendo as sequências que codificam para os anticorpos; sistemas de células de insectos infectadas com vectores recombinantes de expressão de vírus (por exemplo, baculovírus) contendo as sequências que codificam para os anticorpos; sistemas de células vegetais infectadas com vectores recombinantes de

expressão de vírus (por exemplo, o vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; do vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vectores recombinantes de expressão plasmídicos (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo sequências de codificação de anticorpo; ou sistemas de células de mamífero (por exemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) portadores de construções de expressão recombinantes contendo promotores derivados do genoma de células de mamíferos (por exemplo, promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (por exemplo, o promotor tardio do adenovírus, o promotor do vírus vaccinia 7,5 K). De preferência, as células bacterianas tais como *Escherichia coli*, e mais preferencialmente, as células eucarióticas, em particular para a expressão da molécula de anticorpo recombinante inteira, são usados para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, células de mamífero tais como células de ovário de hamster chinês (CHO), em conjunto com um vector tal como elemento promotor do gene precoce intermediário principal do citomegalovírus humano é um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foecking et al., *Gene* 45: 101 (1986); Cockett et al., *Bio/Technology* 8: 2 (1990)).

A linha celular hospedeira utilizada para a expressão de proteínas é frequentemente de origem mamífera; aqueles peritos na técnica são creditados com a capacidade para determinar preferencialmente as linhas celulares hospedeiras particulares que são mais adequadas para o produto génico que se deseja aqui expressar. Exemplos de linhas celulares hospedeiras exemplares incluem, mas não estão limitadas a, CHO (Ovário de Hamster Chinês), DG44 e DUXB11 (linhas de Ovário de Hamster Chinês, sem DHFR), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (linha de rim de macaco), COS (um derivado da CVI com o antigénio SV40 T), VERY, BHK (rim de hamster bebé), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblastos de hamster chinês),

BALBC/3T3 (fibroblastos de rato), HAK (linha de rim de hamster), SP2/O (mieloma de ratinho), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratinho), BFA-1c1BPT (células endoteliais bovinas), RAJI (linfócitos humanos) e 293 (rim humano). As células CHO são particularmente preferidas. Linhagens de células hospedeiras estão normalmente disponíveis a partir de serviços comerciais, da American Tissue Culture Collection ou da literatura publicada.

Além disso, uma estirpe de célula hospedeira pode ser escolhida que modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto génico na forma específica desejada. Tais modificações (por exemplo, glicosilação) e processamento (por exemplo, clivagem) de produtos proteicos podem ser importantes para a função da proteína. Células hospedeiras diferentes têm mecanismos característicos e específicos para o processamento e a modificação pós-tradução de proteínas e produtos génicos. Linhas celulares apropriadas ou sistemas hospedeiros podem ser escolhidos para assegurar a modificação e processamento correcta da proteína estranha expressa. Para este fim, podem ser utilizadas células hospedeiras eucarióticas que possuam a maquinaria celular para o processamento adequado do transcrito primário, glicosilação, e fosforilação do produto génico.

Para a produção em longo prazo, de alto rendimento de proteínas recombinantes, é preferida expressão estável. Por exemplo, as linhas celulares que expressam de forma estável da molécula de anticorpo pode ser manipulada. Em vez de usar vectores de expressão que contenham origens de replicação virais, as células hospedeiras podem ser transformadas com ADN controlado por elementos de controlo de expressão apropriados (por exemplo, promotor, intensificador,

sequências, terminadores de transcrição, locais de poliadenilação, etc.), e um marcador seleccionável. No seguimento da introdução do ADN estranho, as células manipuladas podem ser deixadas crescer durante 1-2 dias num meio enriquecido e depois são mudadas para um meio selectivo. O marcador seleccionável no plasmídeo recombinante confere resistência à selecção e permite às células integrarem estavelmente o plasmídeo nos seus cromossomas e crescer para formar focos que por sua vez podem ser clonados e expandidos em linhas celulares. Este método pode ser vantajosamente utilizado para modificar linhas celulares que expressam de forma estável da molécula de anticorpo.

Podem ser usados diversos sistemas de selecção, incluindo, mas não se limitando à timidina-cinase do vírus do herpes simplex (Wigler et al., *Cell* 11: 223 (1977)), fosforribosiltransferase da hipoxantina-guanina (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 202 (1992)), e fosforribosiltransferase da adenina (Lowy et al., *Cell* 22: 817 (1980)) podem ser empregues em células, respectivamente, tk, hgprt ou aprt. Além disso, a resistência anti-metabolito pode ser utilizada como base de selecção para os genes seguintes: dhfr, que confere resistência ao metotrexato (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. USA* 77: 357 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527 (1981)); gpt, que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072 (1981)); neo, que confere resistência ao aminoglicósido G-418 *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu e Wu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); e Morgan e Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); *TIB TECH* 11(5): 155-215 (Maio, 1993); e hgro, que confere resistência à higromicina (Santerre et al., *Gene* 30: 147 (1984). Métodos vulgarmente

conhecidos na técnica da tecnologia de ADN recombinante que podem ser usados estão descritos em Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NI (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NI (1990); e nos Capítulos 12 e 13, Dracopoli et al. (eds), *Current Prolocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NI (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150: 1 (1981).

Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados através de amplificação do vector (para uma revisão, ver Bebbington e Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in ADN cloning*, Academic Press, Nova Iorque, Vol. 3. (1987)). Quando um marcador no sistema de vector que expressa o anticorpo é amplificável, aumento do nível de inibidor presente na cultura de célula hospedeira irá aumentar o número de cópias do gene marcador. Uma vez que a região amplificada está associada ao gene do anticorpo, a produção do anticorpo também irá aumentar (Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3: 257 (1983)).

A produção *in vitro* permite aumento de escala para se obter grandes quantidades dos polipéptidos desejados. Técnicas para o cultivo de células de mamíferos sob condições de cultura de tecido são conhecidas na técnica e incluem cultura em suspensão homogénea, por exemplo, num reactor airlift ou num reactor de agitação contínua, ou cultura de células imobilizadas, por exemplo, em fibras ocas, microcápsulas, em microesferas de agarose ou cartuchos de cerâmica. Se necessário e/ou desejado, as soluções de polipéptidos podem ser purificadas pelos métodos de cromatografia habituais, por exemplo filtração em gel, cromatografia de permuta troca iónica, cromatografia sobre DEAE-celulose ou cromatografia de

(imuno-)afinidade, por exemplo, depois da biossíntese preferencial de um polipéptido da região "hinge" sintético, ou antes ou depois da etapa de cromatografia HIC aqui descrito.

Os genes que codificam para os anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados da presente divulgação também podem ser expressos em células que não são de mamífero, tais como bactérias ou leveduras ou células vegetais. Bactérias que facilmente incorporam ácidos nucleicos incluem membros da família Enterobacteriaceae, tais como estirpes de *Escherichia coli* ou *Salmonella*; Bacillaceae, tais como *Bacillus subtilis*; pneumococos, estreptococos, e *Haemophilus influenzae*. Será ainda apreciado que, quando expressos em bactérias, os polipéptidos heterólogos normalmente fazem parte de corpos de inclusão. Polipéptidos heterólogos deve ser isolados, purificados e em seguida montados em moléculas funcionais. Quando são desejadas formas de anticorpos tetravalentes, as subunidades, irão então se auto-associar em anticorpos tetravalentes (W002/096948A2).

Nos sistemas bacterianos, uma série de vectores de expressão podem ser vantajosamente seleccionados dependendo da utilização pretendida para a molécula de anticorpo a ser expressa. Por exemplo, quando se pretende produzir uma grande quantidade de tal proteína, para a preparação de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, os vectores que dirigem a expressão de elevados níveis de produtos proteicos de fusão que sejam facilmente purificados podem ser desejáveis. Tais vectores incluem, mas não estão limitados, ao vector de expressão de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., *EMBO J.* 2: 1791 (1983)), em que a sequência de codificação de anticorpo pode ser ligada individualmente no vector em gralha

com a região que codifica para lacZ de forma que seja produzida uma proteína de fusão; vectores pIN (Inouye e Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109 (1985); Van Heeke e Schuster, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509 (1989)); e semelhantes. vectores pGEX podem também ser utilizados para expressar polipéptidos estranhos como proteínas de fusão com glutathione-S-transferase (GST). Em geral, tais proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas das células lisadas por adsorção e ligação a uma matriz de esferas de glutathione-agarose seguida da eluição na presença de glutathione livre. Os vectores pGEX são concebidos para incluir locais de clivagem de trombina ou do factor protease Xa de modo que o produto génico alvo clonado possa ser libertado da porção GST.

Além dos procariotas, podem também ser utilizados micróbios eucarióticos. *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de padeiro comum, é o mais vulgarmente utilizado entre os microorganismos eucariotas, embora um número de outras estirpes estão normalmente disponíveis, por exemplo, de *Pichia pastoris*.

Para a expressão em *Saccharomyces*, o plasmídeo YRp7, por exemplo, (Stinchcomb et al., *Nature* 282: 39 (1979); Kingsman et al., *Gene* 7: 141 (1979); Tschemper et al., *Gene* 10: 157 (1980)) é normalmente utilizado. Este plasmídeo já contém o gene TRP1 que proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura sem a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo ATCC No. 44076 ou PEP4-1 (Jones, *Genetics* 85: 12 (1977)). A presença da deficiência *trp1* como uma característica do genoma da célula hospedeira de levedura proporciona então um ambiente eficaz para detectar a

transformação através do crescimento na ausência de triptofano.

Num sistema de insecto, utiliza-se tipicamente o vírus da poliedrose nuclear *Autographa californica* (AcNPV) usado como um vector para expressar genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência que codifica para o anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (por exemplo o gene da poliedrina) do vírus e colocada sob controlo de um promotor de AcNPV (por exemplo o promotor da poliedrina).

Uma vez que uma molécula de anticorpo da divulgação tenha sido expressa de modo recombinante, pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica para a purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (por exemplo, de permuta iónica, de afinidade, particularmente de afinidade para o antigénio específico após Proteína A, e cromatografia exclusão molecular em coluna), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica convencional para a purificação de proteínas. Alternativamente, um método preferido para aumentar a afinidade dos anticorpos da presente divulgação é divulgado em US 2002 0123057 A1.

VIII. MÉTODOS DE TRATAMENTO USANDO ANTICORPOS Sp35 TERAPÊUTICOS

Tal como aqui descrito, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da divulgação podem aliviar a inibição mediada NgR1 de extensão dos axónios que normalmente tem lugar em neurónios do SNC. Isto é benéfico em situações onde é necessária extensão dos

axónios ou desenvolvimento de neurites no cérebro ou na medula espinal. Lesões na medula espinal, incluindo esmagamento ou ruptura total ou parcial, exemplifica uma situação em que é necessária extensão dos axónios, mas em que é normalmente inibida através de uma operação da via Nogo. Exemplos de doenças ou distúrbios em que a extensão dos axónios e/ou o surgimento das neurites no cérebro seriam benéficas incluem o acidente vascular, esclerose múltipla e outras doenças ou distúrbios neurodegenerativos tais como a esclerose múltipla (MS), a leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), a encefalomielite (EPL), a mielose pântica central (CPM), a adrenoleucodistrofia, a doença de Alexander, a doença de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), a leucodistrofia de células globóides (doença de Krabbe) e degeneração Walleriana, neurite óptica, mielite transversal, esclerose lateral amiotrófica (ELA), a doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, lesão medular, traumatismo crânio-encefálico, lesão pós-irradiação, as complicações neurológicas da quimioterapia, acidente vascular cerebral, neuropatia, neuropatia óptica isquémica aguda, deficiência de vitamina E, síndrome da deficiência de vitamina E isolada, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia trigeminal, paralisia de Bell, lesão da medula espinal e todas as doenças neurológicas relacionadas com a morte celular neuronal.

Os inventores descobriram ainda que Sp35 é expresso em oligodendrócitos, e contribui para a biologia dos oligodendrócitos. Derivados solúveis de Sp35, certos polinucleótidos (por exemplo, ARNi), bem como determinados anticorpos que se ligam especificamente a Sp35, como aqui descrito actuam como antagonistas para a função Sp35 em oligodendrócitos, promovendo a proliferação, diferenciação e sobrevivência de oligodendrócitos e promovendo a mielinização

dos neurónios *in vitro* e *in vivo*. Isso é benéfico para doenças, distúrbios ou condições que envolvem a desmielinização e dismielinização. Exemplos de doenças ou distúrbios em que a proliferação, diferenciação e sobrevivência de oligodendrócitos e/ou a mielinização ou remielinização seriam benéficas incluem a esclerose múltipla (MS), a leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), a encefalomielite (EPL), a mielose pônica central (CPM), a adrenoleucodistrofia, a doença de Alexander, a doença de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), leucodistrofia de células Globóides (doença de Krabbe), a degeneração Wallerina, a neurite óptica, a mielite transversal, a esclerose lateral amiotrófica (ELA), a doença de Huntington, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, lesões da medula espinal, lesão traumática do cérebro, lesão pós-irradiação, complicações neurológicas da quimioterapia, acidente vascular cerebral, neuropatia óptica isquêmica aguda, deficiência de vitamina E, síndrome da deficiência de vitamina E isolada, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia trigeminal e paralisia de Bell.

Assim, um exemplo da presente divulgação proporciona métodos para o tratamento de lesões da medula espinal, doenças ou distúrbios associados com a inibição do crescimento neuronal no SNC, doenças ou distúrbios associados com a inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e doenças que envolvem desmielinização ou dismielinização de neurónios do SNC num animal que sofra de uma tal lesão ou doença, ou que tenha predisposição em contrair tal doença, o método compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo na administração ao animal de uma quantidade eficaz de um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado. Os anticorpos da presente divulgação

são aqui descritos, e incluem os anticorpos monoclonais listados na Tabela 3A e 3B, os anticorpos que se ligam especificamente ao mesmo epítipo como os anticorpos monoclonais listados na Tabela 3A e 3B, os anticorpos que inibem competitivamente a ligação dos anticorpos monoclonais listados na Tabela 3A e 3B para Sp35, e compreendendo polipéptidos e anticorpos derivados a partir dos anticorpos monoclonais indicados na Tabela 3A e 3B.

Um anticorpo Sp35 terapêutico a ser utilizado em métodos de tratamento aqui descritos pode ser preparado e utilizado como um agente terapêutico que promove o crescimento de neurites do SNC, a sobrevivência neuronal, a orientação dos axónios e regeneração dos axónios, que promove a sobrevivência, o crescimento e/ou a diferenciação de oligodendrócitos, e que promove a mielinização ou remielinização de neurónios do SNC. Características de anticorpos Sp35 terapêuticos adequados incluem: ligação a epítopos Sp35 que resultam no bloqueio da actividade Sp35, ligação a Sp35 com afinidade suficiente para induzir um efeito terapêutico, e ligação a Sp35 preferencialmente a parceiros de ligação normais, por exemplo, receptor Nogo.

Anticorpos Sp35 terapêuticos podem ser anticorpos monoclonais, quiméricos ou humanizados, ou fragmentos de anticorpos que se ligam especificamente a Sp35. Os anticorpos podem ser anticorpos monovalentes, bivalentes, polivalentes, ou bifuncionais. Os fragmentos de anticorpos incluem, sem limitação, Fab, F(ab')₂ e Fv.

Anticorpos Sp35 terapêuticas ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados de acordo com a divulgação

podem ser utilizados na forma não conjugada ou não marcada, ou podem ser acoplados ou ligados a fármacos, marcações ou agentes de estabilização que podem ou não exercer efeitos terapêuticos adicionais.

A dosagem específica e o regime de tratamento para qualquer paciente em particular dependerá de uma variedade de factores, incluindo o anticorpo particular Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante ou derivado utilizado, a idade, o peso corporal, a saúde geral, o sexo e a dieta do paciente, e o tempo de administração, a taxa de excreção, a combinação de fármacos, e a gravidade da doença particular a ser tratada. O julgamento de tais factores por prestadores de cuidados de saúde está no âmbito da perícia vulgar na técnica. A quantidade também irá depender do paciente individual a ser tratado, da via de administração, do tipo de formulação, das características do composto utilizado, da gravidade da doença, e do efeito desejado. A quantidade utilizada pode ser determinada por princípios farmacológicos e farmacocinéticos bem conhecidos na técnica.

Nos métodos da divulgação, os anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados, podem ser administrados directamente ao sistema nervoso, por via intracerebroventricular, ou por via intratecal, por exemplo, numa lesão crónica de EM, tal como discutido em maior detalhe abaixo.

Em vários exemplos, um anticorpo Sp35, como descrito acima é um antagonista da actividade de SP35. Em certos casos, por exemplo, a ligação de um anticorpo de Sp35 antagonista a Sp35, como expresso em neurónios, bloqueia a inibição do

crescimento de neurites associada à mielina ou a morte celular neuronal. Noutros exemplos, a ligação do anticorpo Sp35 a Sp35, como expresso em oligodendrócitos, bloqueia a inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, ou bloqueia a desmielinização ou dismielinização de neurónios do SNC.

Em métodos da presente divulgação, um anticorpo SP35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, em especial os anticorpos Sp35 aqui descritos, pode ser administrados directamente como um polipéptido preformado, ou indirectamente através um vector de ácido nucleico, para permitir o crescimento de axónios benéfico, promover a proliferação, diferenciação e sobrevivência de oligodendrócitos e/ou promover a mielinização ou a remielinização.

Nalguns exemplos, um sujeito pode ser tratado com uma molécula de ácido nucleico que codifica para um anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, a variante, ou análogo, por exemplo, num vector. As doses de ácidos nucleicos que codificam para polipéptidos variam de cerca de 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, ou 30-300 µg de ADN por doente. As doses para vectores virais infecciosos variam desde 10-100 ou mais, partículas virais por dose.

Nalguns exemplos da divulgação, um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado é administrado num método de tratamento, que inclui: (1) transformação ou transfecção de uma célula hospedeira implantável com um ácido nucleico, por exemplo, um vector, que expressa um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de

ligação ao antígeno, variante, ou derivado, e (2) a implantação da célula hospedeira transformada num mamífero, no local de uma doença, distúrbio ou lesão. Por exemplo, a célula hospedeira transformada pode ser implantada no local de uma lesão na medula espinal ou num local de dismielinação. Nalguns exemplos da divulgação, a célula hospedeira implantável é removida a de um mamífero, temporariamente cultivadas, transformada ou transfectada com um ácido nucleico isolado que codifica para um anticorpo Sp35, e implantada de volta para o mesmo mamífero da qual foi removido. A célula pode ser, mas não é necessário, removida do mesmo local no qual é implantada. Tais exemplos, por vezes conhecidos na como terapia génica *ex vivo*, pode proporcionar um fornecimento contínuo do polipéptido Sp35 polipéptido, localizado no local do local de acção, durante um período de tempo limitado.

Os métodos para tratar a lesão da medula espinal, as doenças ou distúrbios associados com a inibição do crescimento neuronal no SNC, doenças ou distúrbios associados com a inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e doenças que envolvem a desmielinização ou dismielinação de neurónios do SNC compreendendo a administração de um anticorpo Sp35, ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno, variante ou derivado da divulgação são tipicamente testados *in vitro*, e depois *in vivo*, num modelo animal aceitável, para a actividade terapêutica ou profilática desejada, antes do uso em seres humanos. Modelos animais adequados, incluindo animais transgénicos, são bem conhecidas dos competentes na técnica. Por exemplo, ensaios *in vitro* para demonstrar a utilidade terapêutica do anticorpo Sp35 aqui descritos incluem o efeito de um anticorpo Sp35 numa linha celular ou numa amostra de tecido de um paciente. O efeito do anticorpo Sp35 na linha celular e/ou amostra de

tecido pode ser determinada utilizando técnicas conhecidas pelos especialistas na técnica, tais como os ensaios divulgados aqui noutro lado. De acordo com a divulgação, ensaios *in vitro* que podem ser utilizados para determinar se é indicada a administração de um anticorpo específico Sp35, incluem ensaios de cultura de células *in vitro* em que uma amostra de tecido do paciente é crescida em cultura e exposta ou de outro modo um composto administrado, e o efeito desse composto sobre a amostra do tecido é observada.

Compostos activos suplementares podem também ser incorporados nas composições da divulgação. Por exemplo, um anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado da divulgação pode ser co-formulado com e/ou co-administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais.

A divulgação abrange qualquer método de administração adequado para um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado da divulgação a tecido alvo seleccionado, incluindo a injeção em bolus de uma solução aquosa ou a implantação de um sistema de libertação controlada. A utilização de um implante de libertação controlada reduz a necessidade de injeções repetidas.

IX. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICAS E MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

Os métodos para preparar e administrar Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação a um sujeito que deles necessite são bem conhecidos ou são facilmente determinados pelos peritos na técnica. A via de administração do anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, pode ser, por exemplo, oral, parenteral, por

inalação ou tópica. O termo parenteral como aqui utilizado inclui, por exemplo, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, rectal ou vaginal. Embora todas estas formas de administração sejam claramente contempladas como estando dentro do âmbito da divulgação, uma forma para administração seria uma solução injectável, em particular, para injeção ou gotejamento intravenoso ou intra-arterial. Geralmente, uma composição farmacêutica adequada para injeção pode compreender um tampão (por exemplo, tampão acetato, fosfato ou citrato), um surfactante (por exemplo, polissorbato), opcionalmente, um agente estabilizador (por exemplo albumina), etc. No entanto, noutros métodos compatíveis com os ensinamentos do presente documento, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou derivados da presente divulgação podem ser administrados directamente ao local da população celular adversa, aumentando assim a exposição do tecido doente ao agente terapêutico.

Tal como discutido anteriormente, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser administrados numa quantidade farmacêuticamente eficaz para o tratamento *in vivo* da lesão da medula espinal em mamíferos, das doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento neuronal no SNC, das doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e de doenças que envolvem a desmielinização ou dismielinização do SNC. A este respeito, deve notar-se que os anticorpos descritos serão formulados de modo a facilitar a administração e promover a estabilidade do agente activo. De preferência, as composições farmacêuticas de acordo com a divulgação compreendem um veículo estéril, não-tóxico, farmacêuticamente aceitável, tal como solução salina fisiológica, tampões não-tóxicos, conservantes e

semelhantes. Para os efeitos do presente pedido de patente, uma quantidade farmacêuticamente eficaz de um anticorpo Sp35, ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, conjugado ou não conjugado, significará uma quantidade suficiente para alcançar uma ligação eficaz ao alvo e alcançar um benefício, por exemplo, para melhorar os sintomas de uma doença ou distúrbio ou para detectar uma substância ou uma célula.

As composições farmacêuticas compreendem nesta divulgação veículos farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, por exemplo, permutadores de iões, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas séricas, tais como albumina de soro humana, substâncias tampão, tais como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicéridos parciais de ácidos gordos vegetais, água, sais ou electrólitos, tais como sulfato de protamina, hidrogenofosfato dissódico, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinilpirrolidona, substâncias à base de celulose, polietileno glicol, carboximetilcelulose de sódio, poliacrilatos, ceras, polímeros de blocos de polietileno-polioxipropileno, polietilenoglicol e lanolina.

As preparações para administração parenteral incluem soluções, suspensões e emulsões estéreis aquosas ou não-aquosas. Exemplos de solventes não-aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tais como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis tais como oleato de etilo. Os veículos aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo meios salinos e tamponados. Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, 0,01-0,1 M e preferentemente 0,05 M de tampão

fosfato ou 0,8% de solução salina. Outros veículos parenterais comuns incluem soluções de fosfato de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, lactato de Ringer ou óleos fixos. Os veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluidos e nutrientes, reabastecedores de electrólitos, tais como aqueles baseados em dextrose de Ringer, e semelhantes. Conservantes e outros aditivos podem também estar presentes tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, e gases inertes e semelhantes.

Mais particularmente, composições farmacêuticas adequadas para utilização injectável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação prévia de soluções ou dispersões injectáveis estéreis. Em tais casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida na medida em que possibilita o fácil processamento por seringa. Deve ser estável sob as condições de fabrico e armazenamento e será de preferência preservada contra a acção contaminante de microorganismos, tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e semelhantes), e misturas adequadas destes. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de surfactantes. As formulações adequadas para utilização nos métodos terapêuticos aqui descritos são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16a ed. (1980).

A prevenção da acção de microorganismos pode ser conseguida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis, tais como, sorbitol, manitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injectáveis pode ser conseguida pela inclusão na composição de um agente que atrase a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

Em qualquer caso, as soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas através da incorporação de um composto activo (por exemplo, um anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, por si só ou em combinação com outros agentes activos) na quantidade necessária de um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes aqui enumerados, conforme necessário, seguido de esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas por incorporação do composto activo num veículo estéril, que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários entre os enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem sob vácuo e a liofilização, que resultam num pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma sua solução previamente esterilizada por filtração. As preparações para injeção são processadas, introduzidas em recipientes tais como ampolas, bolsas, garrafas, seringas ou frascos, e seladas em condições assépticas de acordo com métodos conhecidos na técnica. Além disso, as preparações podem ser embaladas e vendidas sob a forma de um kit, tais como aqueles descritos na patente copendente U.S.S.N. 09/259,337 (US-2002-0102208 A1). Tais

artigos de fabrico terão preferivelmente rótulos ou folhetos informativos indicando que as composições associadas são úteis para o tratamento de um indivíduo que sofra de, ou com predisposição para, doenças auto-imunes ou neoplásicas.

As formulações parentéricas podem ser uma única dose de bolus, uma infusão ou uma dose de bolus inicial seguida de uma dose de manutenção. Estas composições podem ser administradas em intervalos fixos ou variáveis específicos, por exemplo, uma vez por dia, ou numa base “conforme necessário”.

Certas composições farmacêuticas podem ser administradas oralmente numa forma de dosagem aceitável, incluindo, por exemplo, cápsulas, comprimidos, suspensões ou soluções aquosas. Certas composições farmacêuticas podem também ser administradas por aerossol nasal ou inalação. Tais composições podem ser preparadas como soluções em solução salina, utilizando álcool benzílico ou outros conservantes adequados, promotores de absorção para aumentar a biodisponibilidade, e/ou outros agentes solubilizantes ou dispersantes convencionais.

A quantidade de um anticorpo SP35, ou um seu fragmento, variante, ou derivado, que pode ser combinada com os materiais veículo para produzir uma forma de dosagem única irá variar dependendo do hospedeiro tratado e do modo particular de administração. A composição pode ser administrada como uma dose única, doses múltiplas ou ao longo de um período de tempo estabelecido numa infusão. Os regimes de dosagem também podem ser ajustados para proporcionar a resposta desejada óptima (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática).

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser administrados a um ser humano ou outro animal de acordo com os métodos de tratamento acima mencionados numa quantidade suficiente para produzir um efeito terapêutico. Os anticorpos SP35, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser administrados a esse ser humano ou outro animal numa forma de dosagem convencional preparada por combinação do anticorpo da divulgação com um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável convencional de acordo com técnicas conhecidas. Será reconhecido por um perito na técnica que a forma e carácter do veículo ou diluente farmacologicamente aceitável é ditada pela quantidade de ingrediente activo com a qual se pretende combinar, a via de administração e outras variáveis bem conhecidas. Os peritos na técnica irão apreciar que um cocktail que compreende uma ou mais espécies de anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados da presente divulgação pode revelar-se particularmente eficaz.

Doses eficazes das composições da divulgação, para o tratamento de lesões da medula espinal, doenças ou distúrbios associados com a inibição do crescimento neuronal no SNC, doenças ou distúrbios associados com a inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e doenças envolvendo desmielinização ou dismielinização do SNC irão variar dependendo de muitos factores diferentes, incluindo os meios de administração, local alvo, o estado fisiológico do paciente, se o paciente é um ser humano ou um animal, outros medicamentos administrados, e se o tratamento é profilático ou terapêutico. Normalmente, o paciente é um ser humano, mas

mamíferos não humanos, incluindo mamíferos transgênicos podem também ser tratados. As dosagens de tratamento podem ser tituladas utilizando métodos de rotina conhecidos pelos peritos na técnica para otimizar a segurança e eficácia.

Para o tratamento de lesões da espinal medula, doenças ou distúrbios associados com a inibição do crescimento neuronal no SNC, doenças ou distúrbios associados com a inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e doenças que envolvem a desmielinização ou dismielinização do SNC com um anticorpo Sp35, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado, a dosagem pode variar, por exemplo, a partir de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg, e mais usualmente de 0,01 a 5 mg/kg (por exemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 1 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal, ou dentro da gama de 1-10 mg/kg, de preferência pelo menos 1 mg/kg. Pretende-se que as doses intermédias nas gamas acima referidas também estão no âmbito da divulgação. Podem-se administrar a indivíduos tais doses diariamente, em dias alternados, semanalmente ou de acordo com qualquer outro programa determinado por análise empírica. Um exemplo de tratamento envolve a administração em doses múltiplas ao longo de um período prolongado, por exemplo, de pelo menos seis meses. Exemplos adicionais de regimes de tratamento implicam a administração uma vez em cada duas semanas ou uma vez por mês ou uma vez a cada 3 a 6 meses. Exemplos de regimes de dosagem incluem 1-10 mg/kg ou 15 mg/kg em dias consecutivos, 30 mg/kg em dias alternados ou 60 mg/kg semanalmente. Nalguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação são administrados simultaneamente, caso em que a dosagem de cada

anticorpo administrado situa-se no interior dos intervalos indicados.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados podem ser administrados em múltiplas ocasiões. Os intervalos entre as doses individuais podem ser diários, semanais, mensais ou anuais. Os intervalos podem ser igualmente irregulares conforme indicado pela medição dos níveis no sangue do polipéptido alvo ou a molécula alvo no paciente. Nalguns métodos, a dose é ajustada para alcançar uma concentração de polipéptido no plasma de 1-1000 µg/ml e, nalguns métodos 25-300 µg/ml. Alternativamente, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados podem ser administrados como uma formulação de libertação sustentada, e nesse caso é necessária uma administração menos frequente. A dosagem e a frequência variam dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente. A meia-vida de um anticorpo Sp35 também pode ser prolongada por meio da fusão a uma porção ou polipéptido estável, por exemplo, PEG ou albumina. Em geral, os anticorpos humanizados apresentam a meia-vida mais longa, seguidos pelos anticorpos quiméricos e anticorpos não-humanos. Num exemplo, os anticorpos SP35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou seus derivados da presente divulgação podem ser administrados numa forma não conjugada. Noutro exemplo, os anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes, ou seus derivados da presente divulgação podem ser administrados várias vezes sob a forma conjugada. Ainda noutro exemplo, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser administrados numa forma não conjugada, de seguida na forma conjugada, ou vice-versa.

As composições da divulgação podem ser administrados por qualquer método apropriado, por exemplo, por via parenteral, por via intraventricular, por via oral, por spray para inalação, por via tópica, por via rectal, por via nasal, por via bucal, por via vaginal ou através de um reservatório implantado. O termo "parenteral", tal como aqui utilizado, inclui técnicas de injeção ou infusão subcutânea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intra-esternal, intratecal, intra-hepática, intralesional e intracraniana ou técnicas de infusão. Tal como descrito anteriormente, anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação actuam no sistema nervoso para promover a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação de oligodendrócitos e mielinização de neurónios e a sobrevivência neuronal, regeneração de axónios e orientação do axónio. Consequentemente, nos métodos da divulgação, os anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados, são administrados de tal forma que eles atravessam a barreira hematoencefálica. Este cruzamento pode ser devido às propriedades físico-químicas inerentes da própria molécula de anticorpo SP35, de outros componentes numa formulação farmacêutica, ou da utilização de um dispositivo mecânico, tal como uma agulha, cânula ou instrumentos cirúrgicos para romper a barreira hematoencefálica. Quando o anticorpo Sp35 é uma molécula que não atravessa inerentemente a barreira hematoencefálica, por exemplo, uma fusão de uma fracção que facilita a travessia, as vias adequadas de administração são, por exemplo, intratecal ou intracraniana, por exemplo, directamente para uma lesão crónica de EM. Quando o anticorpo Sp35 é uma molécula que inerentemente atravessa a barreira hematoencefálica, a via de administração pode ser por uma ou mais das várias vias descritas abaixo. Nalguns métodos, os

anticorpos são administrados como uma composição ou dispositivo de libertação prolongada, tal como um dispositivo Medipad™. A administração através da barreira hematoencefálica pode ser melhorada por uma molécula de transporte, tais como um receptor anti-Fc, a transferrina, receptor anti-insulina ou de um conjugado de toxina ou potenciador de penetração.

Os anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados, utilizados nos métodos da divulgação podem ser directamente introduzidos no cérebro. Vários implantes para infusão directa no cérebro de compostos são conhecidos e são eficazes para a administração de compostos terapêuticos aos pacientes humanos que sofrem de distúrbios neurológicos. Estes incluem a infusão crónica para o cérebro utilizando uma bomba, implantação estereotáctica, cateteres intersticiais temporários, implantes de cateteres intracranianos permanentes, e implantes biodegradáveis implantados cirurgicamente. Ver, por exemplo, Gill *et al.*, "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease," *Nature Med.* 9: 589-95 (2003); Scharfen *et al.*, "High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas," *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 24(4): 583-91 (1992); Gaspar *et al.*, "Permanent ¹²⁵I Implants for Recurrent Malignant Gliomas," *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 43(5): 977-82 (1999); capítulo 66, páginas 577-580, Bellezza *et al.*, "Stereotactic Interstitial Brachytherapy," em Gildenberg *et al.*, *Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery*, McGraw-Hill (1998); e Brem *et al.*, "The Safety de Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Followed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Malignant Gliomas: Phase I Trial", *J. Neuro-Oncology* 26: 111-23 (1995).

As composições podem também compreender um anticorpo Sp35 disperso num material transportador biocompatível que funciona como uma administração adequada ou sistema de suporte para os compostos. Exemplos apropriados de veículos de libertação sustentada incluem matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos moldados, tais como supositórios ou cápsulas. As matrizes de libertação sustentada microcapsular ou implantáveis incluem polilactidos (Patente dos E.U.A. No. 3,773,319, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22: 547-56 (1985)); poli(2-hidroxietil-metacrilato), etileno vinil acetato (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105 (1982)) ou ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988).

Nalguns exemplos da divulgação, um anticorpo Sp35, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado da divulgação é administrado a um paciente através de infusão directa a uma região apropriada do cérebro. Ver, por exemplo, Gill *et al.*, *supra*. Técnicas alternativas estão disponíveis e podem ser aplicadas para administrar um anticorpo Sp35 de acordo com a divulgação. Por exemplo, a colocação de um cateter ou implante estereotáctico pode ser realizada utilizando a unidade de Riechert-Mundinger e a unidade localizante multiuso ZD (Zamorano-Dujovny). A tomografia computadorizada com aumento de contraste (TC), injectando 120 ml de Omnipaque, 350 mg de iodo/ml, com 2 mm de espessura de fatia pode permitir o planeamento de tratamento multiplanar tridimensional (STP, Fischer, Freiburg, Alemanha). Este equipamento permite o planeamento na base em estudos de imagiologia de ressonância magnética, consolidando a

informação da TC e do alvo IRM para confirmação clara do alvo.

O sistema estereotáctico Leksell (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA), modificado para utilização com um digitalizador CT GE (General Electric Company, Milwaukee, WI), bem como o sistema de estereotáctico Brown-Roberts-Wells (BRW) (Radionics, Burlington, MA) pode ser usado para esta finalidade. Assim, na manhã do implante, o anel de base anular da estrutura estereotáctica BRW pode ser anexado ao crânio do paciente. Secções de TC em série podem ser obtidas em intervalos que 3 mm ao longo da região (o tecido alvo) com uma estrutura de vareta de grafite localizadora fixada à placa de base. Um programa de planeamento de tratamento computadorizado pode ser executado num computador VAX 11/780 (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.) usando coordenadas CT das imagens da vareta de grafite para mapear entre o espaço CT e o espaço BRW.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação podem, opcionalmente, ser administrados em combinação com outros agentes que sejam eficazes no tratamento do distúrbio ou condição que necessite de tratamento (por exemplo, profilático ou terapêutico).

X. DIAGNÓSTICOS

A divulgação proporciona ainda um método de diagnóstico útil durante o diagnóstico de doenças ou lesões neuronais, que envolve a medição do nível de expressão da proteína SP35 ou seu transcrito em tecidos ou outras células ou fluido corporal de um indivíduo e comparando o nível de expressão medido com níveis de expressão Sp35 convencionais num tecido

normal ou de fluido corporal, em que um aumento no nível de expressão em comparação com o padrão é indicativo de uma doença.

Os anticorpos específicos para Sp35 podem ser usados para testar os níveis da proteína numa amostra biológica utilizando métodos imuno-histológicos clássicos conhecidos pelos peritos na técnica (por exemplo, ver Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101: 976-985 (1985); Jalkanen, *et al.*, *J. Cell Biol.* 105: 3087-3096 (1987)). Outros métodos baseados em anticorpos úteis para detectar a expressão da proteína incluem imunoensaios, tais como o ensaio de imunossorção associado a enzima (ELISA), imunoprecipitação ou "Western blotting". Ensaaios adequados são descritos em mais pormenor noutro local neste documento.

Por "testando o nível de expressão do polipéptido Sp35" pretende-se medir ou estimar qualitativamente ou quantitativamente o nível do polipéptido Sp35 numa primeira amostra biológica quer directamente (por exemplo, determinando ou estimando o nível absoluto de proteína) ou relativamente (por exemplo, por comparação com o nível de polipéptido associado a cancro numa segunda amostra biológica). Preferencialmente, o nível de expressão do polipéptido Sp35 na primeira amostra biológica é medido ou estimado e comparado a um nível de polipéptido Sp35, sendo o padrão preparado a partir de uma segunda amostra biológica obtida de um indivíduo que não tem a doença ou sendo determinado calculando os níveis médios de uma população de indivíduos que não têm o distúrbio. Como será apreciado na técnica, uma vez que o nível de polipéptido Sp35 "padrão" é conhecido, pode ser utilizado repetidamente como um padrão para comparação.

Por “amostra biológica” entende-se qualquer amostra biológica obtida a partir de uma linha celular, cultura de tecidos ou outra fonte individual de células que potencialmente expressam Sp35. Métodos para a obtenção de biópsias de tecidos e fluidos corporais de mamíferos são bem conhecidos na técnica.

Anticorpos Sp35 para utilização nos métodos de diagnóstico acima descritos incluem qualquer anticorpo Sp35 que se liga especificamente a um produto do gene SP35, como aqui descrito noutro lado.

XI. IMUNOENSAIOS

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, variantes ou derivados da presente divulgação podem ser ensaiados para a ligação imuno específica por qualquer método conhecido na técnica. Os imunoenaios que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitados a sistemas de ensaio competitivos e não competitivos utilizando técnicas tais como “Western blot”, radioimunoenaios, ELISA (ensaio de imunossorção ligado a enzima), imunoenaios “sanduíche”, ensaios de imunoprecipitação, reacções de precipitina, reacções de precipitina de difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação do complemento, ensaios imunorradiométricos, imunoenaios fluorescentes, imunoenaios de proteína A, para apenas citar alguns. Tais ensaios são rotineiros e são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Ausubel et al., eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, Vol. 1 (1994)). Exemplos de imunoenaios são resumidamente descritos abaixo (mas não se pretende a título de limitação).

Protocolos de imunoprecipitação compreendem geralmente a lise de uma população de células num tampão de lise tal como tampão RIPA (1% de NP-40 ou Triton X-100, desoxicolato de sódio a 1%, SDS a 0,1%, NaCl a 0,15 M, 0,01 M de fosfato de sódio a pH 7,2, 1% de Trasylol) suplementado com proteína fosfatase e/ou inibidores da protease (por exemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sódio), adicionando o anticorpo de interesse ao lisado celular, incubando durante um período de tempo (por exemplo, 1-4 horas) a 4°C, a adição de grânulos de proteína G sepharose e/ou proteína A ao lisado celular, incubando durante cerca de uma hora ou mais a 4°C, lavando as esferas em tampão de lise e ressuspensando as esferas em tampão da amostra/SDS. A capacidade do anticorpo de interesse para imunoprecipitar um antígeno particular pode ser avaliada por exemplo, por análise por "Western blot". Um perito na técnica seria sabedor sobre os parâmetros que podem ser modificados para aumentar a ligação do anticorpo a um antígeno e diminuir o ruído de fundo (por exemplo, a limpeza prévia do lisado celular com esferas de sepharose). Para uma discussão mais aprofundada sobre os protocolos de imunoprecipitação ver, por exemplo, Ausubel *et al.*, eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, Vol. 1 (1994) a 10.16.1.

A análise de "Western blot" compreende geralmente a preparação de amostras de proteínas, electroforese das amostras de proteína num gel de poliacrilamida (por exemplo, 8%-20% de SDS-PAGE dependendo do peso molecular do antígeno), a transferência da amostra de proteínas a partir de o gel de poliacrilamida para uma membrana tal como nitrocelulose, PVDF ou nylon, bloquear a membrana em solução de bloqueio (por exemplo, PBS com 3% de BSA ou leite magro),

lavar a membrana em tampão de lavagem (por exemplo, PBS-Tween 20), bloquear a membrana com o anticorpo primário (o anticorpo de interesse) diluído em tampão de bloqueio, lavagem da membrana em tampão de lavagem, o bloqueio da membrana com um anticorpo secundário (que reconhece o anticorpo primário, por exemplo, um anticorpo anti-humano) conjugado com um substrato enzimático (por exemplo, peroxidase de rábano ou fosfatase alcalina) ou uma molécula radioactiva (por exemplo, ^{32}P ou ^{125}I), diluído em tampão de bloqueio, lavando a membrana em tampão de lavagem e detectar a presença do antigénio. Um perito na técnica conhecerá quais os parâmetros que podem ser modificados para aumentar o sinal detectado e reduzir o ruído de fundo. Para uma discussão mais aprofundada relativamente a protocolos de "Western blot" ver, por exemplo, Ausubel et al., eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque Vol. 1 (1994) a 10.8.1.

ELISA compreendem a preparação de antigénio, o revestimento do poço de uma microplaca de 96 poços com o antigénio, adicionando o anticorpo de interesse conjugado a um composto detectável, tal como um substrato enzimático (por exemplo, peroxidase de rábano ou fosfatase alcalina) ao poço e incubando durante um período de tempo, e a detectando a presença do antigénio. Em ELISAs, o anticorpo de interesse não tem que ser conjugado com um composto detectável; em vez disso, um segundo anticorpo (o qual reconhece o anticorpo de interesse) conjugado com um composto detectável pode ser adicionado ao poço. Além disso, em vez de revestimento do poço com o antigénio, o anticorpo pode ser revestido para o poço. Neste caso, um segundo anticorpo conjugado com um composto detectável pode ser adicionado após a adição do antigénio de interesse ao poço revestido. Um perito na técnica conhecerá os parâmetros que podem ser modificados

para aumentar o sinal detectado bem como outras variações de ELISAs conhecidas na técnica. Para uma discussão mais aprofundada sobre os testes ELISA ver, por exemplo, Ausubel *et al.*, eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, Vol. 1 (1994) a 11.2.1.

A afinidade de ligação de um anticorpo a um antígeno e a taxa de dissociação de uma interacção anticorpo-antígeno pode ser determinada por ensaios de ligação competitivos. Um exemplo de um ensaio de ligação competitiva é um radioimunoensaio compreendendo a incubação do antígeno marcado (por exemplo, ^3H ou ^{125}I) com o anticorpo de interesse na presença de quantidades crescentes do antígeno não marcado, e a detecção do anticorpo ligado ao antígeno marcado. A afinidade do anticorpo de interesse para um determinado antígeno e as velocidades de dissociação podem ser determinadas a partir dos dados por análise de gráfico de Scatchard. A competição com um segundo anticorpo pode também ser determinada utilizando radioimunoensaios. Neste caso, o antígeno é incubado com o anticorpo de interesse é conjugado com um composto marcado (por exemplo, ^3H ou ^{125}I), na presença de quantidades crescentes de um segundo anticorpo não marcado.

Anticorpos Sp35, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, variantes ou derivados da presente divulgação, adicionalmente, podem ser empregues histologicamente, como em imunofluorescência, microscopia imunoelectrónica análises não imunológicas, para a detecção *in situ* dos produtos génicos do antígeno de cancro ou de suas variantes conservadas ou fragmentos peptídicos. A detecção *in situ* pode ser conseguida removendo um espécime histológico de um paciente e aplicando ao mesmo um anticorpo Sp35 marcado, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno, variante, ou derivado, de preferência,

aplicado pela sobreposição do anticorpo marcado (ou fragmento) a uma amostra biológica. Através da utilização de tal procedimento, é possível determinar não só a presença da proteína Sp35, ou de variantes conservadas ou fragmentos de péptidos, mas também a sua distribuição no tecido examinado. Utilizando a divulgação, os peritos irão prontamente perceber que qualquer um de uma grande variedade de métodos histológicos (tais como procedimentos de coloração) pode ser modificado, de modo a conseguir uma tal detecção *in situ*.

Os imunoensaios e não-imunoensaios para os produtos do génicos SP35 ou suas variantes conservadas ou fragmentos de péptido compreenderá tipicamente a incubação de uma amostra, tal como um fluido biológico, um extracto de tecido, células recentemente colhidas, ou lisados de células que tenham sido incubados em cultura de células, na presença de um anticorpo marcado de forma detectável capaz de se ligar a Sp35 ou a suas variantes conservadas ou fragmentos de péptidos, e detectar o anticorpo ligado por qualquer um de uma série de técnicas bem conhecidas na técnica.

A amostra biológica pode ser colocada em contacto com e imobilizada num suporte ou veículo de fase sólida tal como nitrocelulose, ou outro suporte sólido que seja capaz de imobilizar células, partículas de células ou proteínas solúveis. O suporte pode então ser lavado com tampões adequados seguido de tratamento com o anticorpo SP35 marcado de forma detectável, ou seu fragmento de ligação ao antigénio, variante, ou derivado. O suporte de fase sólida pode então ser lavado com o tampão uma segunda vez para remover o anticorpo não ligado. Opcionalmente, o anticorpo é subsequentemente marcado. A quantidade de marcação ligada ao

suporte sólido pode então ser detectada por meios convencionais.

Por "suporte ou veículo de fase sólida" entende-se qualquer suporte capaz de se ligar a um antigénio ou um anticorpo. Suportes conhecidos ou veículos incluem vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilases, celulosas naturais e modificadas, poliacrilamidas, gabros e magnetite. A natureza do transportador pode ser solúvel em certa medida ou insolúvel para os fins da presente divulgação. O material de suporte pode ter virtualmente qualquer configuração estrutural possível desde que a molécula acoplada seja capaz de se ligar a um antigénio ou anticorpo. Assim, a configuração do suporte pode ser esférica, como numa conta, ou cilíndrica, como na superfície interior de um tubo de ensaio, ou a superfície externa de uma vareta. Alternativamente, a superfície pode ser plana tal como uma folha, tira de teste, etc. Os suportes preferidos incluem esferas de poliestireno. Os peritos na técnica conhecerão muitos outros veículos adequados para a ligação do anticorpo ou antigénio, ou serão capazes de o determinar através do uso de experimentação de rotina.

A actividade de ligação de um dado lote de anticorpo Sp35, ou um seu fragmento, variante, ou derivado de ligação ao antigénio pode ser determinada de acordo com métodos bem conhecidos. Os peritos na técnica serão capazes de determinar condições de ensaio operativas e óptimas para cada determinação empregando experimentação de rotina.

Existe uma variedade de métodos disponíveis para a medição da afinidade da interacção anticorpo-antigénio, mas

relativamente poucos para determinar constantes de velocidade. A maioria dos métodos dependem da marcação ou do anticorpo ou do antigénio, o que, inevitavelmente, complica as medições de rotina e introduz as incertezas das quantidades medidas.

A ressonância de plasma de superfície (SPR), tal como realizada em BIAcore oferece diversas de vantagens relativamente aos métodos convencionais de medição da afinidade da interações anticorpo-antigénio: (i) não é necessária a marcação do anticorpo ou do antigénio, (ii) os anticorpos não precisam a ser purificados previamente, podendo o sobrenadante da cultura de células ser utilizado directamente, (iii) são permitidas medições em tempo real, permitindo uma comparação semi-quantitativa rápida de diferentes interações de anticorpos monoclonais e são suficientes para muitos fins de avaliação, (iv) a superfície bioespecífica pode ser regenerada de forma que uma série de diferentes anticorpos monoclonais podem ser facilmente comparados em condições idênticas, (v) os procedimentos analíticos estão totalmente automatizados, e podem ser executadas grande séries de medições, sem intervenção do utilizador. BIAapplications Handbook, versão AB (reimpressão 1998), código BIACORE No. BR-1001-86; BIATECHNOLOGY Handbook, versão AB (reimpressão 1998), código BIACORE No. BR-1001-84.

Os estudos de ligação baseados em SPR exigem que um membro de um par de ligação seja imobilizado sobre uma superfície do sensor. O parceiro de ligação imobilizado é referido como o ligando. O parceiro de ligação em solução é referido como o analito. Nalguns casos, o ligando está ligado indirectamente à superfície através da ligação a uma outra molécula imobilizada, que é referida como a molécula de captura. A resposta SPR reflecte uma mudança na concentração mássica à

superfície do detector à medida que os analitos se ligam ou dissociam.

Com base em SPR, as medições BIAcore em tempo real, monitorizam interacções directamente à medida que acontecem. A técnica é bem adequado à determinação de parâmetros cinéticos. A classificação comparativa de afinidade é extremamente simples de executar, e tanto as constantes cinética como as de afinidade podem ser derivadas dos dados do sensorgrama.

Quando o analito é injectado num pulso discreto ao longo de uma superfície de ligando, o sensorgrama resultante pode ser dividido em três fases essenciais: (i) Associação de analito com o ligando durante a injeção da amostra, (ii) Equilíbrio ou estado estacionário durante a injeção da amostra, onde a velocidade de ligação do analito é equilibrada pela dissociação do complexo, (iii) Dissociação do analito a partir da superfície durante o fluxo de tampão.

As fases de dissociação e associação fornecem informações sobre a cinética de interacção analito-ligando (k_a e k_d , as velocidades de formação de complexos e dissociação, $k_d/k_a = K_D$). A fase de equilíbrio fornece informações sobre a afinidade da interacção ligando-analito (K_D).

O programa informático BIAevaluation proporciona amplas ferramentas para ajuste de curvas, utilizando tanto a integração numérica como algoritmos de ajuste globais. Com a análise adequada dos dados, podem-se obter de forma separada as constantes de afinidade e de velocidade para a interacção a partir de investigações BIAcore simples. A gama de

afinidades mensuráveis por esta técnica é muito ampla desde mM a pM.

A especificidade do epitopo é uma característica importante de um anticorpo monoclonal. O mapeamento de epitopos com BIAcore, em contraste com as técnicas convencionais usando radioimunoensaio, ELISA ou outros métodos de adsorção de superfície, não necessita de marcação ou de anticorpos purificados, e permite que testes de especificidade em vários locais, usando uma sequência de vários anticorpos monoclonais. Além disso, um grande número de análises podem ser processadas automaticamente.

Experiências de ligação de pares testam a capacidade de dois MAb se ligarem simultaneamente ao mesmo antigénio. MAb dirigidos contra epitopos separados ligar-se-ão de forma independente, enquanto que MAb dirigidos contra epitopos idênticos ou estreitamente relacionados irão interferir com a ligação um do outro. Estas experiências de ligação com BIAcore são simples de realizar.

Por exemplo, pode-se usar uma molécula de captura para se ligar ao primeiro Mab, seguida pela adição do antigénio e do segundo MAb sequencialmente. Os sensorgramas irão revelar: 1. quanto do antigénio se liga ao primeiro Mab, 2. em que medida o segundo mAb se liga ao antigénio ligado à superfície, 3. se o segundo MAb não se liga, se a inversão da ordem do teste de pares altera os resultados.

A inibição de péptidos é outra técnica utilizada para o mapeamento de epitopos. Este método pode complementar os estudos de ligação de pares de anticorpos, e pode relacionar

epitopos funcionais com características estruturais quando a sequência primária do antígeno é conhecida. Os péptidos ou fragmentos de antígenos são testados relativamente à inibição da ligação de diferentes MAbs para o antígeno imobilizado. Os péptidos que interferem com a ligação de um dado MAb são assumidos serem estruturalmente relacionados com o epitopo definido por aquele MAb.

A prática da presente divulgação irá empregar, a menos que indicado em contrário, técnicas convencionais de biologia celular, cultura celular, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, ADN recombinante, e imunologia, que estão no âmbito da perícia na técnica. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1992), *ADN Cloning*, D. N. Glover ed., Volumes I e II (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, M. J. Gait ed., (1984); Mullis et al. Pat. E.U.A. No: 4,683,195; *Nucleic Acid Hybridization*, B. D. Hames e S. J. Higgins eds. (1984); *Transcription And Translation*, B. D. Hames e S. J. Higgins eds. (1984); *Culture Of Animal Cells*, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); o tratado, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., N.I.; *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, J. H. Miller e M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); *Methods in Enzymology*, Vols. 154 e 155 (Wu et al. eds.); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Mayer e Walker, eds., Academic Press, Londres (1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV, D. M. Weir e C. C. Blackwell, eds., (1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.I., (1986); e em Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Os princípios gerais de engenharia de anticorpos estão apresentados em *Antibody Engineering*, 2ª edição, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995). Princípios gerais de engenharia de proteínas são estabelecidos em *Protein Engineering, A Practical Approach*, Rickwood, D., *et al.*, Eds., IRL Press na Oxford Univ. Press, Oxford, Inglaterra (1995). Princípios gerais de anticorpos e ligação anticorpo-hapteno são apresentados em: Nisonoff, A., *Molecular Immunology*, 2ª ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); e Steward, M.W., *Antibodies, Their Structure and Function*, Chapman e Hall, Nova Iorque, NI (1984). Adicionalmente, os métodos convencionais em imunologia conhecidos na técnica e não especificamente descritos são geralmente levados a cabo como em *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque; Stites *et al.* (eds), *Basic e Clinical-Immunology* (8ª ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) e Mishell e Shiigi (eds), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W.H. Freeman e Co., Nova Iorque (1980).

Obras de referência padrão que estabelecem princípios gerais de imunologia incluem *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque; Klein, J., *Immunology: The Science de Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1982); Kennett, R., *et al.*, eds., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Nova Iorque (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" em Burden, R., *et al.*, eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*,

Vol. 13, Elsevier, Amesterdão (1984), *Kuby Immunnology* 4ª ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt e Barbara A. Osborne, H. Freemond & Co. (2000); Roitt, I., Brostoff, J. e Male D., *Immunology* 6ª ed. Londres; Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. e Lichtman, A., *Cellular and Molecular Immunology* Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); Kontermann e Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Verlag (2001); Sambrook e Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press (2001); Lewin, *Genes VIII*, Prentice Hall (2003); Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); Dieffenbach e Dveksler, *PCR Primer* Cold Spring Harbor Press (2003).

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Sp35 está envolvido na biologia de oligodendrócitos

Os oligodendrócitos amadurecem através de vários estágios de desenvolvimento desde células progenitoras A2B5 (que expressa A2B5), que se diferenciam em oligodendrócitos pré-mielinantes (que expressam O1 e O4) e, finalmente, em oligodendrócitos mileinantes maduros (que expressam O1, O4 e MBP). Assim, através da monitorização da presença e da ausência dos marcadores A2B5, O1, O4 e MBP, é possível determinar a fase de desenvolvimento de uma determinada célula e avaliar o papel de Sp35-Fc na biologia dos oligodendrócitos. Para uma revisão geral da biologia oligodendrócitos, ver, por exemplo, Baumann e Pham-Dinh, Physiol. Rev. 81: 871-927 (2001).

Os anticorpos monoclonais contra O4, MBP e CNPase foram da Sternberger Monoclonals; o anticorpo para APC (clone CC-1; ref. 29) foi da Calbiochem. Outros anticorpos foram para β III tubulina (Covance), Sp35 (Biogen Idec), Fyn (Santa Cruz Biotechnology) e fosfo-Fyn (Biosource). Os anticorpos monoclonais contra A2B5 estão disponíveis da Chemicon.

Sp35 é expresso em oligodendrócitos

A expressão de Sp35 de rato em culturas purificadas de neurónio CG P13 de rato, oligodendrócitos P2, e culturas de astrócitos P4 foi analisada por reacção em cadeia da polimerase após a transcrição reversa (RT-PCR). Um kit da Ambion, Inc. foi usado para extrair o mARN a partir das células de cérebro de rato de acordo com as instruções do fabricante. RT-PCR semi-quantitativo foi realizado utilizando o iniciador directo 5' AGAGACATGCGATTGGTGA 3' (SEQ ID NO: 344), e o iniciador reverso 5 'AGAGATGTAGACGAGGTCATT 3' (SEQ ID NO: 345), e mostrou expressão elevada em neurónios, menor expressão em oligodendrócitos, e nenhuma expressão em astrócitos.

A expressão de Sp35 em oligodendrócitos foi confirmada por hibridização *in situ* em secções derivadas de nervo óptico de rato adulto. Secções do nervo óptico de rato foram preparadas e processadas como descrito em Mi et al., "Sp35 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex," Nat. Neurosci. 7: 221-28 (2004) e sondada ARNs no sentido directo ou inverso de Sp35 marcado com digoxigenina, utilizando os primeiros 500 nucleótidos da sequência que codifica para Sp35. As secções foram coradas de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um kit de amplificação de sinal de tiramida (Amersham Biosciences) e um kit de anticorpo conjugado com anti-digoxigenina fluorescente (Perkin Elmer). Para análises combinadas *in situ* e de imunofluorescência, as secções foram primeiro sondadas com ARN marcado com digoxigenina, e depois com anticorpos, por exemplo, anticorpo CC1 (Calbiochem, um marcador de oligodendrócitos maduros) ou anticorpo anti-Sp35. Observou-se que os oligodendrócitos que hibridaram com uma sonda no sentido inverso Sp35 também co-coraram com um anticorpo para CC1 (dados não mostrados). Não se observou qualquer marcação

específica usando uma sonda no sentido directo Sp35. A expressão de Sp35 em oligodendrócitos foi também confirmada por estudos de imuno-histoquímica de secções de tecido da região do ventrículo lateral do córtex de rato P7. Uma maioria das células do córtex que marcaram com o anticorpo CC1 também marcaram com o anticorpo anti-Sp35. Dados não apresentados. A especificidade da interacção foi confirmada por pré-adsorção do anticorpo anti-Sp35 com Fc (ver Exemplo 2), o que eliminou o sinal.

“Knockdown” da expressão de Sp35 com ARNi específico para Sp35 promove o crescimento e a diferenciação de oligodendrócitos

Usou-se ARNi específico de Sp35 para eliminar a expressão de Sp35 em células precursoras de oligodendrócitos para examinar como Sp35 contribui para o crescimento e a diferenciação de oligodendrócitos. 50000 células precursoras de oligodendrócitos A2B5 foram infectadas com lentivírus que contêm a sequência de ARNi específica para Sp35 ou ARNi de controlo preparado como se segue.

Sequências de ADN de Sp35 murino e de rato foram comparadas para encontrar regiões homólogas para usar para candidatos de ARNs “small-hairpin” (shRNA). Construiu-se CH324, para a expressão em lentivírus de ARNi de Sp35, por emparelhamento dos oligonucleótidos LV1-035 e LV1-036 e ligando a pLL3.7 digerido com *HpaI* e *XhoI*. O vector pLL3.7, metodologias adicionais e a produção de vírus foram conforme descrito em Robinson *et al.*, *Nat. Genet.* 33, 401-06 (2003). Os oligonucleótidos ARNi Sp35 foram adquiridos da MWG e têm as seguintes sequências: LV1-035 (oligo sentido directo) 5'-TCC TCA TCG TGA TGC TAG ACT TCA AGA GAG AGG ATG TCT AGC ACG ATC TTT TTT C - 3' (SEQ ID NO: 346) e LV1-036 (oligo sentido

inverso) 5'-AGA AAA AAG TCG ATC GTC ATC CTG CTA GAC TCT CTT GAA GTC CAG TAG GAT GAC GAT CA-3' (SEQ ED NO: 347).

O ARNi de controlo foi desenhado com as mesmas sequências de oligonucleótidos, excepto para as mudanças de nucleótidos indicados em letras minúsculas: 5'-TGA TCc TCA TcC ttC Tat ACT TCA AGA GAG TgT AGC ATG AGG AcG ATC TTT TTT CTC GA-3' (SEQ ID NO: 348) e 5'-TCG AGA AAA AAG ATC GTC ATC CTG CTA GAC TCT CTT GAA GTa TAG aAG GAT GAC GAT CA-3' (SEQ ID NO: 349).

Antes de se produzir o lentivírus, ADN de pLL3.7 ou shARN candidato em pLL3.7 foram co-transfectados com plasmídeo marcado Sp35-HA murino numa proporção de 5 para 1 em células CHO em um formato de 6 poços. O “knockdown” foi analisado por detecção de “Western blot” da marcação Sp35-HA de lisados de células CHO transfectadas Sp35-HA, bem como por “Northern blot” do ARN total preparado a partir de poços em duplicado. O “blot” foi sondado com um fragmento de cADN de Sp35. Os ensaios foram realizados 48 horas após a transfecção. Como esperado, houve uma redução de 10 vezes de mRNA de Sp35 em células CHO tratadas com ARNi CH324 relativamente às células tratadas com controlo. Dados não apresentados. Os lentivírus de ARNi transportando a proteína verde fluorescente (GFP) foram gerados como descrito em Robinson *et al.* Em culturas tratadas com ARNi controlo ou Sp35, cerca de 80% dos oligodendrócitos foram positivos para GFP. O número total de células não foi alterado pelos tratamentos de ARNi. Para quantificar os efeitos de ARNi na diferenciação, apenas foram contados oligodendrócitos que expressam GFP.

Populações enriquecidas de oligodendrócitos foram cultivadas a partir de ratos P2 Long Evans fêmea, tal como descrito por Conn, *Meth. Neurosci.* 2: 1-4 (Academic Press, 1990) com

modificações como se segue. Resumidamente, o cérebro anterior foi dissecado e colocado em solução salina tamponada de Hank (HBSS; Invitrogen). O tecido foi cortado em fragmentos de 1 mm e foi incubado a 37°C durante 15 minutos em 0,01% de tripsina e 10 µg/ml de ADNase. As células dissociadas foram plaqueadas em frascos de cultura de tecidos T75 revestidos com em poli-L-lisina e foram cultivadas a 37°C durante 10 d em meio DMEM com 20% de soro fetal de vitelo (Invitrogen). Recolheram-se precursores de oligodendrócitos (A2B5⁺) agitando o frasco durante a noite a 200 rpm, a 37°C, resultando numa população com uma pureza de 95%. As culturas foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco com elevada concentração de glucose (DMEM) com FGF/PDGF (10 ng/ml; Peprotech) durante 1 semana. A remoção da FGF/PDGF permitiu a diferenciação das células A2B5⁺ em oligodendrócitos premielinantes O4⁺ após 3-7 d, e a diferenciação em oligodendrócitos maduros O4⁺ e MBP⁺ após 7-10 d. Esses estados de diferenciação são facilmente visíveis por alterações na morfologia: as células A2B5⁺ têm uma forma bipolar, os oligodendrócitos premielinantes O4⁺ têm processos mais longos e ramificados os oligodendrócitos maduros MBP⁺ contêm estruturas de folha de mielina entre processos.

As células precursoras de oligodendrócitos A2B5 foram infectadas com o lentivírus contendo o ARNi CH324. As células resultantes foram cultivadas durante 3 dias e contou-se o número de oligodendrócitos positivos para O4 (um marcador para a diferenciação dos oligodendrócitos). A expressão endógena de Sp35 foi reduzida por infecção lentivírus ARNi Sp35 e foi confirmada por RT-PCR. A redução de Sp35 resultou em mais oligodendrócitos maduros, altamente diferenciados quando comparados com as células de controlo infectadas, como se tornou evidente pelo aumento do comprimento dos processos celulares e pela presença de abundantes estruturas de folha

de mielina (dados não apresentados). Em células que expressavam ARNi Sp35, observaram-se três vezes mais oligodendrócitos maduros (positivos para O4) do que nas culturas de controlo. Estes dados indicam que Sp35 podem regular negativamente a diferenciação dos oligodendrócitos.

Sp35 dominante-negativa promove o crescimento e a diferenciação de oligodendrócitos

Foram construídos vectores lentivirais que expressam o tipo nativo e uma forma dominante-negativa de Sp35. A sequência de ADN que codifica para Sp35 de rato de comprimento total (FL-Sp35, resíduos de aminoácidos 34-614 da SEQ ID NO: 2) foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores 5' - GAG GAT GAC GCG GCC CTC GCA TGG ACA CAC CAG AGA TCC TG - 3' (SEQ ID NO: 350) e 5' - GGG GCG TTG GAA GAT CCT CAC TCC TCT TCT AGA GAG ATG AG-3' (SEQ ID NO: 351) e inserido no vector lentiviral HRST-IRESegFP nos locais *NotI* e *BamHI*. Do mesmo modo, a sequência de ADN que codifica para Sp35 dominante negativo (DN-Sp35, resíduos de aminoácidos 34-581 da SEQ ID NO: 2) foi amplificado por PCR, utilizando os iniciadores 5' - GAG GAT GAC GCG CCG CTC ACG TGG ACA CAC CAG AGA TCC TG 3' (SEQ ID NO: 352) e 5' - GAT ACG GAT CCT CAG CCT TTG CCC CGG AGA CTC CAT AAC AGC - 3' (SEQ ID NO: 353). Os plasmídeos FL-Sp35 e DN-Sp35 foram transfectados em células 293 para a produção de lentivírus, como descrito por Robinson *et al.*, "A lentivirus-based system to functionalmente silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference," *Nat. Genet.* 33: 401-06 (2003). Os oligodendrócitos estavam infectados com lentivírus a 2 MOI por célula e confirmou-se a expressão de FL-SP35 e DN-SP35 por "western blot".

DN-Sp35 promoveu a diferenciação dos oligodendrócitos, produzindo um aumento no número de oligodendrócitos maduros. Pelo contrário, a sobre-expressão de Sp35 de comprimento completo (FL-Sp35) teve o efeito oposto e inibiu a diferenciação, como ficou evidente pela redução no número de oligodendrócitos maduros quando comparados com o controlo (dados não apresentados).

EXEMPLO 2

Construção e purificação da proteína de fusão Sp35-Fc

Preparou-se uma construção através da fusão da porção extracelular de Sp35 humana (resíduos 1-532) às regiões "hinge" e Fc de IgG1 humana para estudar a função biológica de Sp35. Uma sequência de codificação parcial para Sp35 humano foi obtida por PCR a partir do clone 227.2 utilizando o iniciador directo 5' - CAG CAG GTC GAC GCC GCG CGC TGC TGG CGG GGG GCG T - 3' (SEQ ID NO: 354) e o iniciador inverso 5' - CAG CAG GTC GAC CTC GCC CGG CTG GTT CAA GGC CCA GCC GGG CGA GGT CGA CCT CGA GG - 3' (SEQ ID NO: 355).

O produto de PCR de extremidades não coesivas foi subclonado no local *SrfI* do vector PCR SCRIPT AMP (Stratagene) para criar PCR SCRIPT AMP-Sp35. Um fragmento *SalI* foi isolado a partir de PCR SCRIPT AMP-Sp35 e subclonado no vector PCRCAMP Ig (derivado do vector da Stratagene PCR SCRIPT AMP). No vector PCRCAMP Ig, a sequência "hinge" e a sequência gama Fc são subclonadas como um fragmento *SalI*(5') a *NotI*(3'). O fragmento Sp35 *SalI* foi subclonado no local de *SalI* do vector PCRCAMP Ig fundindo assim a sequência de sinal e o domínio extracelular de Sp35 (codões 1-532) em grelha com as sequências que codificam para a região "hinge" e Fc de Ig1 humano. Foram identificados isolados correctos, e um fragmento *NotI* que abrange o fragmento Fc de Sp35 foi

subclonado no local de clonagem NotI único do vector de expressão para CHO, PV90 (Biogen Idec). O plasmídeo resultante foi confirmado por sequenciação de ADN e designado GT123.

Linhas celulares estáveis que expressam a proteína de fusão Sp35-Fc foram geradas por electroporação de células hospedeiras DG44 de CHO com o plasmídeo GT123. As células CHO transfectadas foram cultivadas em MEM alfa menos na presença de soro dialisado a 10% e glutamina a 4 mM para seleccionar para o crescimento independente de nucleósidos. Catorze dias após a transfecção, as células foram alimentadas com meio fresco. Para seleccionar as células que expressam Sp35-Fc, as células CHO foram marcadas com IgG anti-humano de cabra marcado com ficoeritrina (PE) (Jackson Labs) e submetidas a triagem por citometria de fluxo de alta velocidade num FACS Mo-Flo (Cytomation). Foram escolhidas as células que expressam os níveis mais altos de Sp35-Fc. Essas células foram expandidas em cultura durante 7 dias, em seguida, novamente marcadas e de novo triadas. As células que expressam os níveis mais altos de Sp35-Fc foram isoladas como clones individuais em placas de 96 poços. Estes clones foram cultivados durante duas semanas e, em seguida, alimentou-se meio fresco um dia antes da análise FACS para verificar os níveis de expressão. Os clones que expressaram os níveis mais elevados de Sp35-Fc foram expandidos, e os bancos de células congeladas foram estabelecidos. As linhas celulares foram adaptadas para crescer em cultura de suspensão em meio isento de soro BCM16. O título de Sp35-Fc produzido por estes clones foi determinado através do crescimento de linhas celulares a 37°C durante 4-5 passagens, em seguida, crescer as células a 50% da densidade celular máxima e cultivá-las durante 10-15 dias, a 28°C até que a densidade de células viáveis diminuiu para 75%. Neste momento, os meios de cultura foram

recolhidos, limpos de células e detritos por centrifugação, e os sobrenadantes da cultura titulados para os níveis de Sp35-Fc por meio de análise de “Western blot” utilizando um anticorpo Ig anti-humano (Jackson Lab.) como a sonda.

A proteína de fusão Sp35-Fc foi purificada do meio de cultura clarificado como se segue: 9 ml de IM de HEPES pH 7,5 foi adicionado a 900 ml de meio condicionado. O meio foi carregado em lotes durante 3 h a 4°C em 3 ml de Protein A Sepharose (Amersham Bioscience). A resina foi recolhida numa coluna de 1,5 cm (D.I.) e lavou-se quatro vezes com 3 ml de PBS, duas vezes com 4 ml de PBS contendo 800 mM de NaCl, e depois novamente com 3 ml de PBS. A Sp35-Fc foi eluída da coluna com 25 mM de NaH_2PO_4 , pH 2,8 e 100 mM de NaCl em fracções de 1,5 ml e neutralizada pela adição de 75 μl de NaH_2PO_4 a 0,5 M, pH 8,6. As fracções contendo o pico de proteína foram identificadas por absorvância a 280 nm, reunidas, e submetidas a purificação adicional numa coluna de 1 ml de Proteína A. Antes da carga, adicionou-se NaCl a 600 mM e HEPES, pH 7,5 a 50 mM. A coluna foi lavada duas vezes com 600 μl de HEPES a 10 mM pH 7,5 e NaCl a 1 M, e em seguida com 1 mL de PBS. Eluiu-se Sp35-Fc da coluna com 25 mM de NaH_2PO_4 , pH 2,8 e NaCl a 100 mM, recolhendo fracções de 0,5 mL, e neutralizou-se pela adição de 25 μl de 0,5 M de NaH_2PO_4 , pH 8,6. As fracções contendo o pico de proteína foram identificadas por absorvância a 280 nm e reunidas. Através de SDS-PAGE em condições redutoras, a proteína Sp35-Fc migrou como uma única banda (pureza > 95%), com uma massa aparente de 90 kDa. Sob condições não redutoras, a proteína correu como um dímero com uma massa de aproximadamente 180 kDa. A proteína purificada Sp35-Fc foi recolhida em alíquotas e armazenada a -70°C.

EXEMPLO 3

Produção de Anticorpos Monoclonais Específicos para Sp35

Os anticorpos anti-Sp35 que se ligam especificamente a um polipéptido Sp35 da divulgação foram preparados utilizando os seguintes métodos e procedimentos.

A. Ensaios de Rastreio de Anticorpos

1. Ensaio ELISA

Adicionou-se Sp35-Fc (0,5 µg em 50 µl de tampão de bicarbonato de sódio a 0,1 M, pH 9,0) a cada poço de placas de 96 poços MaxiSorp™ (Nunc™). As placas foram então incubadas a 37°C durante 1 hora ou 4°C durante 16 horas. Locais de ligação não específicos nas placas foram bloqueados usando HEPES a 25 mM, pH 7,4 contendo BSA a 0,1%, ovalbumina a 0,1%, 0,1% de (5% (p/v) de leite em pó magro em 150 mM de NACE), e 0,001% de azida. As diluições de soro ou de sobrenadantes de hibridoma (por exemplo, diluições em série de três vezes) foram adicionadas ao longo de cada fila da placa, e incubou-se a 25°C durante 1 hora. Depois de se lavar três vezes com PBS, adicionou-se 50 µl de uma diluição 1:10000 de anticorpo secundário anti-ratinho de cabra conjugado com peroxidase de rábano (Jackson ImmunoResearch Inc.) a cada poço e incubou-se durante mais 1 hora. Após três lavagens, a cor foi revelada por TMB (Pierce) e parou-se com 2 M de ácido sulfúrico. A intensidade da cor foi monitorizada num espectrofotômetro a 450 nm.

2. Ensaio FACS

Células CHO ou células COS-7 foram marcadas com 0,1 µM CellTracker™ CMFDA verde (Molecular Probes, Eugene, OR),

conforme descrito pelo fornecedor. Volumes iguais de células controlo marcadas com CellTracker™ foram misturadas com células Sp35-COS-7 ou células-CHO-Sp35 lavadas (produzidas por transfecção transiente do vector de expressão Sp35) antes da incubação com o soro de teste anti-Sp35 ou sobrenadantes de hibridoma. Cinquenta microlitros da mistura de células foi distribuída em cada poço de uma placa de 96 poços de poliestireno com fundo em V (Costar® 3877, Corning, NI, EUA) e adicionou-se 100 µl de soro de ratinho, sobrenadante de hibridoma ou um controlo de anticorpo anti-Sp35. Após incubação a 4°C durante 30 minutos, as células foram lavadas e incubadas com 50 µl de anticorpo secundário específico Fc gama IgG anti-ratinho de cabra fragmento F(ab')₂ puro por afinidade conjugado com ficoeritrina (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA) em PBS. No final da incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e suspensas em 200 µl de PBS contendo 1% de soro fetal bovino (FBS), e submetidas a análise por FACS. Alternativamente, células Sp35-COS-7 foram misturados com soro de ratinho ou sobrenadante de hibridoma e em seguida tratou-se com anticorpo secundário anti-ratinho de cabra conjugado com R-ficoeritrina e directamente submetido a análises de FACS convencional.

B. Produção de Anticorpos Monoclonais Murinos Anti-Sp35 por Hibridoma

Ratinhos RBF fêmea com oito semanas de idade (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) foram imunizados por via intraperitoneal com a emulsão contendo 50 µg de Sp35-Fc (aminoácidos 34 a 532 da SEQ ID NO: 2 fundido à região "hinge" e à região Fc de IgG1 humano), produzido como descrito no Exemplo 2 ou foram imunizados intraperitonealmente com uma emulsão contendo 50 µg de Sp35-Fc humano, e 50 µl de adjuvante completo de Freund (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO) uma vez cada duas

semanas. Os soros dos ratinhos imunizados foram recolhidos antes da primeira imunização e 1 semana após a segunda e terceira imunizações, e os títulos dos anticorpos anti-Sp35 foram medidos por ensaio de FACS em células COS-7 que expressam Sp35, tal como descrito acima. Uma dose final de reforço foi administrada após a terceira imunização, e três dias antes do início das fusões de hibridoma.

Os soros de ratinhos imunizados com os vários péptidos Sp35 foram testados por ELISA, como descrito acima. Os ratinhos que foram positivos para anticorpos que se ligam especificamente a células COS-7 que expressam Sp35 foram identificados por citometria de fluxo (FACS), como descrito acima, e foram sacrificados. Esplenócitos foram isolados dos ratinhos e fundiram-se com o mieloma FL653 (um derivado APRT de um mieloma de ratinho Ig-/HGPRT-Balb/c, mantido em DMEM contendo FBS a 10%, 4500 mg/L de glucose, 4 mM de L-glutamina, e 20 mg/ml de 8-azaguanina) como descrito em Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, ed. Kennett, R.H., McKearn, T.J. e Bechtol, K.B. Nova Iorque: Plenum Press (1982). As células fundidas foram plaqueadas em placas de 24 ou de 48 poços (Corning Glass Works, Corning, NI, EUA), e alimentadas com adenina, aminopterina e timidina (AAT, disponível a partir de Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO) contendo meio de cultura. Culturas resistentes AAT, foram testados por ELISA ou citometria de fluxo, tal como descrito acima, relativamente à ligação ou a células COS-7-Sp35 ou a Sp35-Fc. Os hibridomas positivos foram ainda subclonados por diluição limitante.

Dezassete linhas de células de hibridoma produtoras de anticorpos monoclonais produzidas a partir de ratinhos imunizados com Sp35-Fc foram isoladas. As propriedades dos

anticorpos monoclonais derivados de hibridoma são apresentadas nas Tabelas 3A e 3B.

Os polinucleótidos que codificam para os domínios variáveis (V_H e V_L) dos anticorpos monoclonais 1A7, 2F3, 3P1D10.2C3 e 3P1E11.3B7 foram isolados por PCR, clonados e foram submetidos a análise de sequência pelo método seguinte. O RNA total foi extraído de células de hibridoma utilizando o RNeasy® mini-kit da Qiagen® and gerou-se cADN a partir de ARN isolado por RT PCR, utilizando condições convencionais. Um cocktail de iniciadores foi utilizado para o RT-PCR. Um conjunto preferido de iniciadores incluiu um iniciador com a extremidade 5' do iniciador que hibrida com a sequência de sinal e a extremidade 3' do iniciador que hibrida com o domínio constante 3' da junção FR4/domínio constante. Isto permite a amplificação de um domínio variável intacto sem ambiguidades relativamente à extremidade N do anticorpo monoclonal e à junção V/C. Um perito na técnica reconhecerá que é necessária a modificação de conjuntos de iniciadores para amplificar diferentes moldes e para diferentes condições de PCR. Ocasionalmente, a presença de mensagens não produtivas altamente abundantes (por exemplo, a cadeia leve não produtiva de grelha deslocada CDR3-FR4 do parceiro de fusão) ou mensagens produtivas inespecíficas podem ser produzidas e complicar a clonagem de cadeias variáveis. Uma solução é a utilização de dados de sequência da extremidade N a partir do anticorpo purificado autêntico para desenhar um iniciador degenerado para permitir a clonagem. Alternativamente, pode-se utilizar um "quadro universal" de iniciadores, tais como os descritos em Orlandi *et al*, PNAS 86: 3833 (1989), que "corrigem" as extremidades N e C dos domínios variáveis (isto é, a extremidade N de FR1 e a extremidade C de FR4 são determinadas pelo iniciador).

Além disso, os dados de sequência para o desenho de iniciadores mais eficazes, podem ser obtidos a partir dos produtos em bruto de RT-PCR que foram purificados em gel e de seguida sequenciados. O produto de PCR também pode ser subclonado utilizando, por exemplo, o TOPO Cloning Kit (Invitrogen) e depois sequenciação. Os dados de sequência de são então obtidos a partir de múltiplos subclones independentes ou fragmentos purificados em gel para estabelecer firmemente a sequência de consenso.

A sequência da cadeia leve do P1E11.3B7 foi determinada utilizando um cocktail de iniciadores de sequência de sinal da cadeia leve kapa murina 5: (i) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GGA TTT GGT TCA GCA GAT TTT CAG 3' (SEQ ID NO: 356), (ii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GTC ACA GRA KAC YCA GGT CTT YRT A 3' (SEQ ID NO: 357), (iii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GAA GTT GCC TGT GCT TAG GTT G 3' (SEQ ID NO: 358), e (iv) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GAG GKC CCC WGC TCA GYT YCT KGG A 3' (SEQ ID NO: 359), com um único iniciador de domínio kapa constante murino 3': 5' GCG TCT AGA ACT GGA TGG TGG GAG ATG GA 31 (SEQ ID NO: 4), onde K = G/T, R = A/G, W = A/T e Y = C/T. O produto de PCR resultante foi subclonado e foram sequenciados múltiplos subclones independentes. A sequência de consenso deduzida era consistente com os dados de sequenciação de degradação de Edman. A sequenciação indicou que o iniciador 5' da sequência de sinal degenerada 5' GGG GAT ATC CAC CAT GTC ACA GRA KAC YCA YRT CTT GGT A 3' (SEQ ID NO: 357) foi a que proporcionou o domínio variável de cadeia leve 3P1E11.3B7 durante a amplificação.

A sequência de cadeia pesada 3P1E11.3B7 foi determinada utilizando um cocktail de iniciadores de PCR 5' da sequência sinal da cadeia pesada murina: (i) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GGR

ATG SAG CTG KGT MAT SCT CTT 3' (SEQ ID NO: 360) (ii) 5' GGG GAT ATC CAC CTT CGG CAT GRA GYT CTK GAG GGT TTT 3' (SEQ ID NO: 361), e (iii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GGC CTT TGT GGG GCT GCT CTT CT 3' (SEQ ID NO: 362), com um iniciador 3' do domínio constante CH1 IgG murino degenerado 5' AGG TCT AGA AYC TCC ACA CAC AGG RRC CAG TGG ATA GAC 3' (SEQ ID NO: 363), em que K = G/T, M = A/C, R = A/G, e Y = C/T. PCR utilizando este cocktail de iniciadores, com uma variedade de diferentes condições dos ciclos, não conseguiu produzir uma sequência de domínio variável de cadeia pesada em que a extremidade N deduzida fosse consistente com a sequência determinada por degradação de Edman do anticorpo 3P1E11.3B7 purificado. Portanto utilizámos os iniciadores universais da cadeia pesada: FR1 5' AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G 3' (SEQ ID NO: 364) e FR4 5' TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA G 3' (SEQ ID NO: 365), em que M = A/C, R = A/G, S = C/G, e W = A/T. Este conjunto resultou num domínio variável de cadeia pesada murino cuja sequência deduzida foi consistente com os dados empíricos 3P1E11.3B7.

De modo a verificar que as extremidades N e C do domínio variável de cadeia pesada eram autênticos e não determinados pelo iniciador, uma outra reacção de PCR foi realizada com um iniciador de sequência de sinal degenerado 5' ATG TGG AAY GAR TGY ATH CTN CCN TTY A 3' (SEQ ID NO: 366) e o iniciador 3' do domínio constante acima mencionado iniciador 5' AGG TCT AGA AYC TCC ACA CAC AGG RRC CAG TGG ATA GAC 3' (SEQ ID NO: 367), em que H = A/C/T, N = A/C/G/T, R = A/G, e Y = C/T. O desenho do iniciador da sequência de sinal degenerado foi baseado em sequências de sinal que originaram melhores correspondências derivados de uma pesquisa TFASTA da base de dados de sequências de roedores Genbank consultada com a sequência FR1 deduzida de consenso 3P1E11.3B7 da reacção de PCR com o "iniciador universal" acima descrito. Este PCR originou um

produto com um domínio variável de cadeia pesada de murino completo.

Os domínios variáveis de murino 3P1E11.3B7 completos foram usados (com mutagênese silenciosa quando necessário para introduzir locais de restrição), em conjugação com cADNs do domínio kapa constante e de IgG1 humana para construir cADNs quiméricos das cadeias pesada e leve, respectivamente. Os cADNs de imunoglobulinas de comprimento total foram subclonados num vector de expressão denominado pNE001, um derivado do pCEP4, vector de expressão episomal de células de EBV comercial. Os vectores de expressão de cadeia pesada e leve (chamados pXW372 e pXW363, respectivamente) foram co-transfectados em células 293-EBNA. A análise de “Western blot” (sondada com reagentes específicos para a IgG humana) de meio condicionado de células transfectadas de forma transiente, confirmou a expressão de kapa mAb, 3P1E11.3B7-huIgG1 quimérico. As sequências de polipéptido resultantes VH e VL 3P1E11.3B7 estão apresentadas nas Tabelas 6 e 8 e são SEQ ID NOs: 173 e 209, respectivamente. As sequências da cadeia pesada e leve para a 1A7, 2F3, e 3P1D10.2C3 anticorpos monoclonais foram determinados por métodos semelhantes.

C. Identificação de Anticorpos Monoclonais Anti-Sp35 por Apresentação de Fagos

Fragmentos Fab de anticorpos monoclonais anti-Sp35 foram identificados e isolados a partir de bibliotecas de apresentação de fagos como descrito em Hoet *et al.*, *Nat. Biotech.* 23: 344-348 (2005); Rauchenberger, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278: 194-205 (2003); e Knappik, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296: 57-86 (2000).

A biblioteca de apresentação de fagos Fab MorphoSys HuCAL® GOLD ("Biblioteca de Apresentação de Fagos-2" na Tabela 3B), que compreende as regiões variáveis de anticorpos sintéticos humanizados foi pesquisada relativamente à proteína Sp35-Fc solúvel humana recombinante por métodos de rastreio ELISA e IHC convencionais. Ver, por exemplo, Ostendorp, R., Frisch, C. e Urban M, "Generation, engineering and production of human antibodies using HuCAL®." *Antibodies, Volume 2 Novel Technologies and Therapeutic Use*. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum 13-52 (2004). Fagos-Fab que se ligaram especificamente a Sp35 foram purificados e caracterizados. As propriedades destes fragmentos Fab anticorpos monoclonais derivados da apresentação de fagos são apresentados na Tabela 3B como "fragmentos Fab monoclonais derivados da biblioteca de apresentação de fagos-2". O fago-Fab 1968 isolado foi escolhido para análise posterior.

EXEMPLO 4

Imunoprecipitação de Sp35 por anticorpos monoclonais Anti-Sp35

Para realizar a imunoprecipitação, foram produzidas células COS-1 que expressam Sp35, fundidas com uma marcação de hemaglutinina (HA) na extremidade N, por transfecção transiente de células COS-1 com uma construção de ADN que expressa a proteína Sp35 de comprimento total com uma marcação HA. As células foram recolhidas 48 horas após a transfecção e foram lisadas em 1 ml de tampão de lise (50 mM de HEPES, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA, 1% de Triton X-100 e glicerol a 10%) durante 30 min a 4°C. Após centrifugação a 14000xg durante 15 minutos, os sobrenadantes foram incubados com esferas de Proteína A/G-Sepharose (Santa Cruz), a 4°C durante 1 hora, e, em seguida, incubou-se a 4°C durante 1 hora com os anticorpos monoclonais

murinos anti-Sp35 1A7 ou 2F3. As esferas foram lavadas três vezes com tampão de lise, fervidos em tampão de amostra de Laemmli, submetidas a 4-20% SDS-PAGE e analisadas por "Western blotting" utilizando um anticorpo que reconhece o marcador HA. Tal como mostrado no gel de SDS-PAGE, os anticorpos monoclonais 1A7 e 2F3, imunoprecipitaram Sp35 humana e murina (Fig. 1). Como apresentado na Fig. 1, o anticorpo monoclonal 2F3 imunoprecipitou fortemente ambas as Sp35 humana e murina, enquanto que o anticorpo monoclonal 1A7, que imunoprecipitou fortemente a Sp35 humana, apenas reconheceu a proteína Sp35 murina fracamente. Da mesma forma, os anticorpos monoclonais 1G7, 2B10, 2F3, 3P4C2.2D2, 3P4C8.2G9, Li01, Li03, Li05, Li06, Li07, Li08, Li11, Li12, 7P1D5.1G9 e 3B5.2 imunoprecipita Sp35 humano e de ratinho ou humano ou de ratinho (Ver Tabela 3B e 3C). Além disso, Li08 imunoprecipita AP-Sp35 e os anticorpos monoclonais 1B6.4 e 3E3.1 imunoprecipitam Sp35 endógeno (Ver Tabela 3B).

EXEMPLO 5

Anticorpo Anti-Sp35 Que Se Liga Especificamente a Sp35 Determinada por ELISA

De modo a determinar quais as regiões do polipéptido Sp35 foram ligados pelos vários anticorpos monoclonais derivados de hibridomas e de apresentação de fagos produzidos no Exemplo 2, um ensaio de ELISA foi realizado utilizando um painel de polipéptidos Sp35 truncados, cada um fundida às regiões "hinge" e Fc de IgG1 pelos métodos descritos no Exemplo 1. O painel consistiu nos seguintes fragmentos de Sp35: aminoácidos 34-425 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos 417-532 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos 417-493 da SEQ ID NO: 2, e os aminoácidos 34-532 da SEQ ID NO: 2. Ovalbumina e BSA foram utilizadas como controlo. Como mostrado no Quadro 3B, mAbs

2F3, 2B10, 3A3, 3P4c2.2d2 e 3P4c8.2g9 derivados de hibridoma e mAbs 3383, 3563, 3564, 3565, 3568, 3569, 3570 e 3582 derivados de fago-Fab todos se ligaram especificamente aos fragmentos 1-417 e 1-534 de Sp35, sugerindo que estes anticorpos se ligam a epitopos na região LRR de Sp35. Mabs 1A7, 3P1B11F9, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C63G10.2H7, 2P2C9.2G4, 3P4A61D9 e 394C51D8 derivados de hibridoma e Mabs 3495, 3566, 3567, e 1968, derivados de fago-Fab ligaram-se especificamente ao fragmento 34-532 de Sp35 e ligaram-se fracamente ao 417-532 de Sp35, sugerindo que estes anticorpos provavelmente se ligam a epitopos que, pelo menos, incluem uma porção da extremidade C da região de LRR de Sp35. Em experiências similares, estes últimos anticorpos também se ligaram especificamente a um polipéptido Sp35 que consiste nos aminoácidos 34-534 de Sp35 humano e baixa afinidade relativamente a Sp35 de ratinhos e ratos. A afinidade destes últimos anticorpos para Sp35 de ratinhos e rato foi restaurada para o nível observado usando Sp35 humano quando o aminoácido 419 de Sp35 de ratinho ou rato é alterado de histidina (H) para arginina (R). A arginina é o aminoácido na posição 419 em Sp35 humano. A K_D para o anticorpo monoclonal 1A7 foi determinada ser 10 nM (1×10^{-9} M) para a ligação a Sp35 humano e 20 μ M (2×10^{-5} M) para a ligação a Sp35 murino. Para ELISA de Ap-SP35 para detectar os anticorpos ligados à região 417-532, realizou-se ELISA como se segue: Os Mabs foram usados para revestir placas de ELISA, em seguida, incubadas ou com uma proteína de fusão Sp35-AP a 4°C durante a noite, seguido por (H+L) anti-humano ligado a AP (1:5000, Jackson ImmunoResearch) à TA durante 1 hora, ou com proteínas de fusão com AP a 4°C durante a noite. O substrato AP foi então revelado por 10 mg/ml de 4NPP em 0,1 M de Glicina, 1 mM de $MgCl_2$, 1 mM de $ZnCl_2$, pH 10,5, e lido a D.O. 405.

Em experimentos similares, anticorpos monoclonais 3B5.2 e 7P1D5.1G9, bem como o fragmento Fab do anticorpo 7P1D5.1G9 foram testados em ensaios ELISA pela sua capacidade de ligar ao Sp35 humano, e total região LRR de Sp35, a região Ig de Sp35 e Sp35 de murino. Como mostrado na Tabela 3C, 3B5.2, 7P1D5.1G9 e 7P1D5.1G9 e o fragmento Fab de ligação humano e o Sp35 murino. Os anticorpos monoclonais 3B5.2, 7P1D5.1G9 também ligam com a região LRR de Sp35. Ver Tabela 3C.

Num ensaio de ligação Sp35 com monoclonais 3B5.5 fixados a parte inferior de uma cultura de tecidos, os seguintes anticorpos não boqueiam 3B5.2 de ligação de Sp35 : Li03, Li05, Li08, Li011 e o Fragmento Fab de Li013.

EXEMPLO 6

Anticorpo Anti-Sp35 que se liga Especificamente a Sp35

Determinado por FACS

Para caracterizar adicionalmente as propriedades de ligação de mAbs anti-Sp35 derivados de hibridoma 1A7 e 2F3 produzidos como descrito no Exemplo 3, a ligação tanto às células COS-7 ou 293 vivas e fixas que expressam Sp35 de rato ou humano foram comparadas. Células Sp35 transfectadas e não transfectadas foram fixadas e sujeitas a análise por FACS (FACS: As células transfectadas com Sp35 de rato ou humano ou controlo do vector foram dissociadas de placas de cultura, lavadas com 2% de FBS/PBS, e incubadas com o anticorpo primário a 1 µg/ml em gelo durante 1 h. As células foram lavadas três vezes com 2% de FBS/PBS, depois incubadas com o anticorpo secundário marcado com PE (1:100, JacksonImmuno Research) em gelo durante 30 min. Depois de 2 lavagens com 2% de FBS/PBS, as células foram fixadas em 2% de PFA e sujeitas a análise de FACS com PE). O resultado de FACS mostrou que os MAb 1A7 e 2F3 ligados a células COS-7 ou 293 que expressam

Sp35, mas não se ligam a células controle sem expressão de Sp35 (Fig. 2).

Em experiências semelhantes, as células de CHO estavelmente transfectadas com Sp35 foram utilizadas em análise por FACS para caracterizar melhor as propriedades de ligação de 3B5.2 e 7P1D5.1G9. Como mostrado na FIG. 11, 3B5.2 e 7P1D5.1G9 ligam a Sp35 em células CHO transfectadas. Especificamente, o 3B5.2 e anticorpos 7P1D5.1G9 foram testados quanto à sua capacidade para se ligar as células CHO transfectadas com, e expressando, humano ou murino Sp35. Como mostrado na FIG. 11, o número de células a 3B5.2 e anticorpos 7P1D5.1G9 ligado, tal como medido pela fluorescência média (FCM), aumentou com a concentração de anticorpos utilizados. Além disso, o anticorpo 3B5.2 liga mais células como medidos pela fluorescência média (FCM) que 7P1D5.1G9.

EXEMPLO 7

Ensaio de Crescimento de Neurites

Para testar a capacidade dos anticorpos monoclonais derivados de fago-Fab e de hibridoma produzidos acima em reverter o efeito inibidor dos inibidores de mielina do SNC, por exemplo, OMgp, em neurónios, revestiram-se lâminas de cultura Lab-Tek® (4 poços) com 0,1 mg/ml de poli-D-lisina (Sigma®). Colocam-se pontos de Ap-OMgp (1 µg/ponto) ou PBS como gotas de 3 µl. As lâminas de Lab-Tek® foram em seguida lavadas e revestidas com 10 µg/ml de laminina (Gibco™). Gânglios da raiz dorsal (DRG) de crias de ratos Sprague Dawley P6-7 foram dissociadas com 1 mg/ml de collagenase de tipo 1 (Worthington), trituradas com o pipetas Pasteur polidas à chama pré-plaqueadas para enriquecer em células neuronais e finalmente plaqueadas a 10000 células/poço nas lâminas de cultura Lab-Tek® pré-revestidas. Adicionaram-se dez µg/ml de mAb 2F3 ou 1A7 imediatamente após o plaqueamento das DRG. O

meio de cultura foi F12 (disponível na Gibco/Invitrogen) contendo 5% de soro de cavalo inativado pelo calor do doador, 5% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 50 ng/ml de factor de crescimento do nervo de ratinho (mNGF) e incubou-se a 37°C e 5% de CO₂ durante 6 horas. Após a incubação, as lâminas foram fixadas em 4% de paraformaldeído /20% de sacarose e coradas com anticorpo TUJ1 anti- β III-tubulina (Covance) após 16 horas.

Como anticorpo secundário, adicionou-se Alexa Fluor® 594 anti-rato (Molecular Probes) diluído a 1:300 às lâminas e incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com Gel/Mount™ (Biomedica™). 5x imagens digitais foram obtidas com o software OpenLab™ (Improvision, Inc., Lexington, MA), e as imagens foram analisadas para quantificação do crescimento de neurites utilizando o software OPENLAB™, tudo de acordo com os parâmetros especificados pelo fabricante.

Ambos os MAbs e 1A7 e 2F3 protegeram os neurónios DRG da inibição do crescimento de neurites mediada por OMgp. (Fig. 3). 3B5 também protegeu os neurónios DRG de inibição OMgp-mediados de desenvolvimento de neurites (dados não mostrados)

EXEMPLO 8

O Anticorpo Monoclonal 1A7 Promove a Recuperação Funcional no Modelo de Lesão da Espinal Medula do Rato

A lesão da medula espinal ("SCI") foi induzida por sobre-hemi-secção dorsal como se segue, modificado dos métodos descritos anteriormente (Li, S. et al. *J. Neurosci.* 24, 10511-10520 (2004)). Ratos fêmea Long Evans anestesiados (7 semanas de idade, Charles River) receberam analgesia pré-operatória (Buprenorfina/Buprenex, 0,05 mg/kg s.c.) e

tranquilizados (Midazolam, 2,5 mg/kg i.p.) e realizou-se uma hemi-secção dorsal na vértebra torácica 6/7 interrompendo completamente o tracto corticoespinhal (CST) dorsomedial e dorsolateral principal. Os componentes dorsal e dorso-lateral do tracto corticoespinhal (CST) foram completamente interrompidos e a porção ventral do CST deixados intactos. A ponte de tecido ventral remanescente após hemi secção constituiu aproximadamente 20% do cordão em ambos os grupos de tratamento (dados não apresentados).

A função dos membros posteriores foi quantificada utilizando o método de pontuação de campo aberto de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) (Eby, M.T. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 15336-15342 (2000)) e todos os animais apresentaram défices funcionais marcados após a SCI, com quase completa paralisia dos membros posteriores ao dia depois da cirurgia. Imediatamente após a transsecção CST, um cateter intratecal foi inserido no espaço subaracnóide em T7 e ligado a uma bomba mini-osmótica ferrada (Alzet modelo 2004, Alza Corp) inserida no espaço subcutâneo. As bombas mini-osmóticas administraram proteína de controlo IgG de isotipo humano (5 mg/ml) ou anticorpo monoclonal 1A7 (4,8 mg/ml) continuamente a uma taxa de 0,25 µl/h ao longo de 5 semanas. Os animais controle (tratados com IgG humana) recuperaram substancialmente a função ao longo da duração da experiência de 5 semanas, mas estabilizaram às 3-4 semanas, acabando por atingir uma pontuação média de 9 BBB $\pm$ 0,45 (Fig. 7). Pelo contrário, a infusão intratecal contínua de 1A7 durante 5 semanas após a transsecção da medula espinal resultou numa melhora significativa nas pontuações de BBB nos animais do grupo de controlo ao longo de cinco semanas, com uma melhoria contínua da função no prazo de 2-5 semanas, atingindo uma pontuação média de 11,1 BBB $\pm$ 0,7 (Fig. 4). Estes resultados demonstram que o tratamento com o anticorpo monoclonal 1A7

anti-Sp35 promoveu a recuperação da função após a lesão da medula espinal, como demonstrado por um aumento da pontuação de BBB, pela regeneração dos axónios e pela menor retracção dos axónios observada por coloração immuno-histoquímica dos axónios. O anticorpo 3B5.2 também promove a recuperação da lesão medular (dados não mostrados)

EXEMPLO 9

Os anticorpos anti-Sp35 1A7, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 6P4F4.1D3, 6P4F4.1F9, 7P1D5.1G9, Li05, Li06, Li08, Li13, Li28, Li33, D05 , D08 e 3B5.2 promovem a mielinização *in vitro*

O papel de anticorpos anti-Sp35 1A7 e 2F3 na mielinização foi investigado *in vitro* por tratamento de co-culturas de neurónios do gânglio da raiz dorsal (DRG) e de oligodendrócitos com anticorpos anti-Sp35 1A7 e 2F3 e testando a mielinização por immuno-histoquímica e “Western blot”. Para estes estudos, foi necessário primeiro gerar culturas primárias de neurónios de DRG e de oligodendrócitos.

Gânglios da raiz dorsal de ratinhos E14-E17 Long Evans fêmea embrionários foram cultivados como descrito por Plant *et al.*, *J. Neurosci.* 22: 6083-91 (2002). DRGs dissecados foram plaqueados em lamelas revestidas com poli-L-lisina (100 µg/ml) durante 2 semanas. As células foram incubadas na presença de fluorodesoxiuridina durante 2-6 dias e em meio NLA contendo 1 x B27, com 100 ng/ml de NGF (Gibco) durante 8-11 dias.

Oligodendrócitos de ratos Long Evans fêmea com 2 dias de idade (P2) foram cultivados como descrito por Conn, *Meth. Neurosci.* 2: 1-4 (Academic Press, 1990) com modificações como se segue. Resumidamente, o prosencéfalo foi extirpado de ratos P2 e colocado em meio HBSS frio (Gibco). Os fragmentos de tecido foram cortados em pedaços de 1 mm e incubou-se a

37°C durante 15 minutos em 0,01% de tripsina e 10 µg/ml de ADNse. As células dissociadas foram plaqueadas um fiasco de cultura de tecidos T75 e crescidas em meio DMEM com 20% de soro fetal bovino a 37°C durante 10 dias. Os oligodendrócitos positivos para A2B5 foram recolhidos agitando os frascos durante a noite a 200 rpm, a 37°C. Os oligodendrócitos A2B5 foram cultivados durante 7 dias em DMEM (Gibco) contendo 25 mM de D-glucose, 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 50 µg/ml de apo-transferrina humana, 5 µg/ml de insulina pancreática bovina, 30 nM de selenato de sódio, 10 nM de hidrocortisona, 10 nM de D-biotina, 1 mg/ml de BSA, 10 ng/ml FGF e PDGF (Peprotech). As células foram então recolhidas por tripsinização. As células foram em seguida co-cultivadas com os neurónios DRG na presença ou na ausência de 1, 3, 10 ou 30 µg/ml de anticorpos monoclonais anti-Sp35 1A7 ou 2F3, ou um anticorpo de controlo negativo em meio NLA contendo 2% de soro fetal bovino, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 100 ng/ml de NGF (Gibco). Uma dose eficaz para administrar o anticorpo num tal ensaio foi determinada como estando na gama de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml, dependendo do anticorpo. Um perito na técnica seria capaz de determinar uma dose eficaz utilizando os ensaios aqui descritos.

O meio de cultura foi mudado e os vários anticorpos monoclonais foram reabastecidos cada três dias. Após 30 dias a 37°C, as células co-cultivadas foram coradas por coloração imuno-histoquímica ("IHC") para neurofilamentos com anticorpo anti-βIII-tubulina para identificar axónios, ou anticorpo anti-MBP para identificar oligodendrócitos (Fig. 4A-E). As células co-cultivadas também foram lisadas e sujeitas a análise de "Western blot" para quantificar MBP (Fig. 4G). Com base nas análises de IHC e "Western blot", as células co-cultivadas tratadas com anticorpos anti-Sp35 1A7 e 2F3 mostraram um aumento da sobrevivência dos oligodendrócitos e

neurónios, aumento do número de axónios em feixes e aumentar o número de células positivas para MBP (Fig. 4F, 10 vezes mais as células positivas para MBP em comparação com o co-culturas controlo tratadas com anticorpo).

Numa experiência semelhante, oligodendrócitos e co-culturas DRG foram incubadas na presença ou ausência de anticorpos anti-Sp35 Li05 e Li06, ou um anticorpo de controlo negativo. As células em co-cultura foram lisadas e sujeitas a análise de "Western blot" para quantificar a MBP (Fig. 8). Com base em análises de "Western blot", as células co-cultivadas tratadas com anticorpos anti-Sp35 Li05 e Li06 apresentaram um aumento do número de células positivas para MBP, semelhantes às células de co-cultivadas tratadas com 3, 10 e 30 µg de SP35-Fc (LINGO-1-Fc).

Em experiências semelhantes, co-culturas de oligodendrócitos e DRG foram incubadas na presença ou ausência de anticorpos anti-SP35 3B5.2, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 6P4F4.1D3, 6P4F4.1F9, 7P1D5.1G9, Li08, Li13, Li28, Li33 e também promoveram a mielinização. De modo semelhante, os anticorpos completos D05 e D08 também promoveram a mielinização. A menor dose eficaz do anticorpo 3B5.2 e 7P1D5.1G9 necessário para promover a mielinização no teste DRG co-cultura foi de 0,1 µg/ml.

Além disso, o fragmento Fab 7P1D5.1G9 foi testado num ensaio de mielinização in vitro semelhante. O fragmento Fab 7P1D5.1G9 promoveu a mielinização a uma concentração de 1,0 µg/ml.

Estes resultados indicaram que o tratamento de co-culturas de DRG-oligodendrócitos com anticorpos anti-Sp35 1A7, 2F3, 3P1D10.2C3 3P1E11.3B7, 6P4F4.1D3, 6P4F4.1F9, 7P1D5.1G9, Li05, Li06, Li08, Li13, Li28, Li33, D05, D08 e 3B5.2 promoveu

interacções de axónios de oligodendrócitos maduros e mielinização em comparação com co-culturas tratadas com o anticorpo de controlo.

EXEMPLO 10

O anticorpo anti-Sp35 promove a sobrevivência de oligodendrócitos e a mielinização *in vivo*

Ratinhos C57Bl/6 macho adultos nativos foram alimentados com cuprizona (0,2% em peso moída com ração para ratinho) durante 6 semanas para induzir desmielinização no corpo caloso de acordo com o método descrito por P Morell *et al.*, *Mol Cell Neurosci.* 12: 220-7 (1998). Resumidamente, o anticorpo monoclonal 1A7 anti-Sp35 foi estereotacticamente injectado no corpo caloso desmielinizante nas semanas 2, 2,5, e 3 semanas de alimentação de cuprizona, segundo o método descrito abaixo. Ratinhos controlo foram estereotacticamente injectados nos mesmos intervalos com meio esterilizado contendo anticorpo controlo. Depois das 6 semanas a alimentação de cuprizona foi completada, os ratos retornaram a uma dieta normal durante 2, 4 e 6 semanas (apenas ração para ratinhos moída) para permitir a remielinização.

Os anticorpos monoclonais 1A7 e de controlo foram apresentados como se segue. Os ratinhos tratados com cuprizona foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e posicionados num aparelho de imobilização para cirurgia estereotáctica (David Kopf Instruments). O escalpe foi aberto e os compostos estéreis injectados (1 μ M em 1 ml de HBSS) unilateralmente no corpo caloso agudamente desmielinizado dos ratinhos receptores nativos com uma seringa Hamilton de 10 μ l através de coordenadas estereotácticas de 0,7 mm por trás e 0,3 mm ao lado do bregma, a uma profundidade de 1,7 mm (Messier *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63: 313-18

(1999)). Ratinhos controlo receptores adicionais foram injectados estereotacticamente com HBSS não contendo compostos. A abertura no crânio foi preenchido com Gelfoam e a área foi esfregada com penicilina e estreptomicina (Gibco), e a ferida foi suturada. Foram sacrificados ratinhos a cada semana de teste após a injeção e os seus cérebros removidos e processados para análise molecular, bioquímica e histológica.

Os animais que receberam o anticorpo anti-Sp35 tratamento 1A7 mostraram um aumento da sobrevivência de oligodendrócitos maduros (com base na coloração de anticorpos CC1, Fig. 5A) e da mielinização dos axónios por IHC utilizando o anticorpo anti-proteína MBP ou azul "luxol fast" (Fig. 5B). Oligodendrócitos positivos para o anticorpo-CC1 foram quantificados às quatro semanas e 6 semanas (Fig. 5C). Estes resultados indicam que o tratamento com o anticorpo anti-Sp35 1A7 promoveu a sobrevivência de oligodendrócitos maduros e a mielinização dos axónios em comparação com ratos tratados com anticorpo de controlo. Do mesmo modo, os animais que receberam o anticorpo 1A7 ou 1 µg/ml de 7P1D5.1G9 fragmento de Fab num modelo lisolecitina de desmielinização também promoveu a mielinização dos axónios em comparação com animais de controlo.

EXEMPLO 11

O anticorpo anti-Sp35 1A7 promove a sobrevivência das células do gânglio retinal (RGC) no modelo de transsecção do nervo óptico

O anticorpo anti-Sp35 1A7 foi testado num modelo de transsecção do nervo óptico, que investiga os factores que afectam a função neuronal. Ratos Sprague-Dawley jovens adultos fêmea (SD) foram utilizados neste estudo. O nervo óptico direito de cada animal foi seccionado

intraorbitalmente 1,5 mm do disco óptico. Um pedaço de Gelfoam embebido com 6% Fluoro-Gold (FG) foi aplicado no local recentemente seccionado mesmo por trás do disco óptico para marcar as células do gânglio retinal sobreviventes (RGCs). Os animais foram divididos em três grupos (n = 6 em cada grupo) que receberam os anticorpos anti-Sp35 1A7, anticorpo de controlo, ou apenas PBS, por injeção intravítrea. O volume de cada injeção intravítrea foi de 4 µl enquanto que a dosagem de cada injeção foi de 2 µg. As injeções intravítreas foram realizadas imediatamente após a transsecção do nervo óptico.

Deixou-se os animais sobreviver durante 1 semana. Dois dias antes de se sacrificados os animais, o nervo óptico esquerdo de cada animal foi transseccionado e administrou-se 6% de FG como descrito acima, para marcar as RGCs sobreviventes, para servir como controlo interno. Os animais foram sacrificados com uma overdose de Nembutal e as retinas dissecadas em paraformaldeído a 4%. Quatro cortes radiais foram feitos para dividir as retinas em quatro quadrantes (superior, inferior, nasal e temporal). As retinas foram então pós-fixados no mesmo fixador durante 1 hora antes de serem montados planos com o meio de montagem (Dako). As lâminas foram examinadas sob um microscópio de fluorescência, utilizando um filtro de ultravioletas (comprimento de onda de excitação = 330-380 nm). RGCs marcadas foram contadas ao longo da linha média de cada um dos quadrantes, a partir do disco óptico para a fronteira periférica da retina em intervalos de 500 µm, sob uma grelha ocular de 200 X 200 µm². A percentagem de CGRs sobreviventes resultantes de cada tratamento foi expressa através da comparação do número de CGRs sobreviventes nos olhos lesionados com os seus olhos contra-laterais. Todos os dados foram expressos como média ± EPM. A significância estatística foi avaliada por ANOVA, seguida de um teste *post*

hoc de Tukey-Kramer. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Animais tratados com anticorpo anti-Sp35 1A7 apresentaram mais sobrevivência neuronal (80%) em comparação com os animais tratados com o anticorpo controlo ou com PBS, cada um dos quais apenas apresentaram aproximadamente 50% de sobrevivência neuronal (Fig. 6).

EXEMPLO 12

Teste de anticorpos anti-Sp35 para a remielinização no modelo de esmagamento do nervo óptico

O nervo óptico direito é completamente esmagado por acção de um fórceps #5 durante 10 segundos a cerca de 1,5 mm detrás do globo ocular intraorbitalmente imediatamente antes da administração de 2 μ l de anticorpo monoclonal 1A7, 2F3, Li05 e Li06 em 2 ml por injeção intravítrea.

Os animais recebem uma segunda injeção intravítrea do mesmo tratamento, uma semana após a cirurgia. Duas semanas após a cirurgia, faz-se uma perfusão aos animais com fixadores de microscopia electrónica, procede-se a uma pós-fixação e preparam-se seções semifinas e ultrafinas. As seções longitudinais do nervo óptico estão coradas e preparados para observação de mielina. A mielinização das partes proximal e distal do nervo óptico esmagado são comparadas entre os diferentes grupos de tratamento. Os animais tratados com Sp35-Fc e 1A7, 2F3, Li05 e Li06, assim como os controlos apropriados, serão analisados para remielinização na parte distal do nervo óptico em comparação com os controlos.

EXEMPLO 13

Teste de anticorpos anti-Sp35 para regeneração do axónio no modelo de esmagamento do nervo óptico

O nervo óptico direito foi esmagado por acção de um fórceps #5 durante 10 segundos a cerca de 1,5-2 mm para detrás do globo ocular intraorbitalmente imediatamente antes da administração de 2 µg de anticorpo monoclonal 1A7 em PBS por injeção intravítrea. 4 ratos foram testados com o anticorpo 1A7 e 8 os ratos foram usados como animais de controlo. Os animais receberam uma segunda injeção intravítrea de um mesmo tratamento, uma semana após a cirurgia. Três dias antes do sacrifício dos animais em teste (dia 11 da experiência), injectou-se 2 ml de CTB-FITC intravitrealmente para marcação, anterógrada, dos axónios do nervo óptico regenerativos. Ao 14º dia após a cirurgia, procedeu-se à perfusão e pós-fixação dos animais. O nervo óptico esmagado foi processado para secções longitudinais congeladas. Os axónios marcados com CTB-FITC, que atravessam o local da lesão foram contados como fibras regenerativas a várias distâncias para além do local de esmagamento. Quando se injectou 1A7 no olho, a regeneração dos axónios foi observada até 250 µm para além do local do esmagamento. Ver Fig. 10.

EXEMPLO 14

Os anticorpos anti-Sp35 promovem a remielinização e reparação do nervo óptico usando o modelo de rato EAE induzida pela MOG.

Para estas experiências, foi usado o modelo de rato de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) induzida pela Glicoproteína Mielina do Oligodendrócito (MOG). Este é o modelo animal para a esclerose múltipla humana. Emulsificou-se 50 µl de 200 ng de adjuvante completo de Freund (Chondrex Inc.) mais 50 µl de 50 µg MOG em solução salina (1:1) e manteve-se em gelo antes de ser injectado por via intradérmica na base da cauda de cada animal. Ratos Norway castanhos fêmea, com 8-10 semanas de idade, foram utilizados

para todas as experiências. Observação geral na técnica indica que o modelo EAE é induzido a cerca de 15 dias após a injeção de MOG. Os ratos são pontuados relativamente a sinais clínicos de EAE. Os sinais são pontuados do seguinte modo: grau 0,5, paresia distal da cauda, grau 1, paralisia completa da cauda; grau 1,5, paresia da cauda e leve paresia da perna posterior; grau 2,0, paresia grave unilateral da perna posterior; grau 2,5, paresia grave bilateral dos membros posteriores; grau 3,0, paralisia bilateral completa dos membros posteriores; grau 3,5, paralisia completa bilateral dos membros posteriores e paresia de um membro dianteiro; paralisia de grau completo (tetraplegia), estado moribundo ou morte. Os animais recebem o tratamento uma vez que o modelo de EAE é induzido.

Injectou-se intravitrealmente 2 µg/µl de um anticorpo anti-Sp35 (1A7) no dia 15 após indução MOG-EAE. Injectou-se mais duas vezes 2 µg/µl de anticorpo anti-Sp35, 1A7, no dia 22 e no dia 28. Após a finalização da experiência, procedeu-se á perfusão dos animais com PFA a 4%. Os nervos ópticos foram pós-fixados em OsO₄ a 1%, desidratados e embebidos em Epon. Seções semifinas (1 µM) foram cortados e coradas com azul de toluidina para avaliação da mielinização. Os nervos ópticos dos animais tratados foram comparados com aqueles dos animais não tratados relativamente à regeneração dos axónios e para a remielinização no nervo óptico. Todos os procedimentos foram realizadas seguindo um protocolo aprovado pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Os animais que receberam tratamento com o anticorpo anti-Sp35 1A7 apresentou remielinização e reparação do nervo óptico em comparação com os nervos ópticos normais ou animais que foram submetidos a EAE induzida pela MOG, mas que não receberam tratamento (Fig. 9). Na Fig. 9C, as setas apontam para

axónios mielinizados. Os animais que receberam um anticorpo que reconhece o domínio III da Proteína G de *Streptococcus* (MOPC21) não específico para Sp35, não apresentou sinais de remielinização ou reparação do nervo óptico, em comparação com os nervos ópticos normais ou os nervos ópticos de animais não tratados (dados não apresentados). O anticorpo antagonista Sp35 1A7 promoveu a remielinização e reparação de nervos ópticos num modelo de neurite óptica num rato EAE induzida por MOG (Fig. 9).

EXEMPLO 15

Teste de anticorpos anti-Sp35 para a promoção da remielinização do SNC usando o modelo de ratinho EAE induzido por MOG

É induzida EAE na estirpe mista 129B6 de ratinhos através de imunização intradérmica (dia 0) com 100 µg de proteína MOG1-125 emulsionada com adjuvante completo de Freund (CFA). O volume injectado é de 100 µl por rato e é distribuído por três locais (pavilhão do ouvido, costas e pele). A emulsão é preparada a partir de uma proporção de 1:1 em volume e contém 1 mg/ml de MOG1-125 e 2 mg/mL de *M. tuberculosis* (estirpe H37Ra, Chondrex). A toxina pertussis (200 ng/ratinho) é administrada intraperitonealmente no momento da imunização e 2 dias depois. São registados diariamente o peso corporal e os graus clínicos de EAE (0 = sem sinais clínicos; 1 = cauda mole, 2 = fraqueza dos membros posteriores, limitações no reflexo de endireitamento ou marcha bamboleada, 3 = paralisia completa dos membros posteriores ou ausência do reflexo de endireitamento, 4 = paralisia completa dos membros posteriores com algum grau de envolvimento dos membros, 5 = animais totalmente paralisados; 6 = moribundo ou morto). Todos os procedimentos são realizados seguindo um protocolo, aprovado pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Os animais recebem o tratamento com anticorpos

monoclonais 1A7, 2F3, Li05 e Li06 ou anticorpos de controlo no dia 0 do estudo. São recolhidas amostras de sangue são recolhidas em diversos momentos ao longo das experiências pela técnica sangramento retro-orbital. O plasma é separado das PBMC por centrifugação e a fenotipagem das células é realizada por coloração de FACS. O perfil da resposta humoral de anticorpos anti-MOG é realizada por ELISA utilizando mAbs específicos para a subclasse/isotipo (Pharmingen). No final de cada experiência, o cérebro, a espinal medula, os nervos ópticos e os nervos ciáticos são recolhidas após a perfusão.

Este mesmo protocolo é usado para induzir a EAE em ratinhos "knockout" Sp35 e aqueles da mesma ninhada. Ratinhos "knockout" Sp35 normalmente apresentam uma menor pontuação de EAE (1,5), e não apresentam recaídas em relação ao controlo (durante um período de 45 dias), que os animais da mesma ninhada (EAE pontuação 3,5).

Animais tratados com Sp35-Fc e 1A7, 2F3 serão analisadas relativamente à remielinização em comparação com o controlo.

A proteína MOG₁₋₁₂₅ com cauda His foi expressa em *Pichia pastoris* utilizando um promotor TetO-AOX1 indutível pela doxiciclina (M. Levesque, D. Krushinskie e K. Strauch, manuscrito em preparação). A sequência de codificação extracelular (Gly1 até Gly125 da proteína madura após remoção da sequência de sinal) de MOG de rato foi amplificada por PCR usando os seguintes iniciadores: 5' GGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGCATCATCATCATCATATGGGACAGTTCAGAGTGATAGGG 3' (SEQ ID NO: 368), e 5'TTCGCGCCGCTATTAGCCAGGGTTGATCCAGTAGAAGGG3' (SEQ ID NO: 369).

EXEMPLO 16

Construção de Variante de 3B5.2

O seguinte é a sequência de aminoácidos da cadeia leve variável (VL) do anticorpo 3B5.2, os CDRs são sublinhados e do sítio de glicosilação N-ligada está em negrito e em duplo sublinhado: QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSSASSRVS YVHWYQQKSG TSPKRWLYDT SNLASGVPAR FGGNGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW STNPPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 417). Para determinar se a expressão do anticorpo 3B5.2 e/ou ligação do anticorpo para Sp35 foi afectada pela remoção do local de glicosilação, uma variante de 3B5.2 foi construída. Especificamente, as posições de Kabat 63-68 em FR3 foram mutados para a sequência de cadeia leve murino kappa e consenso humano SGSGSG (SEQ ID NO: 418). O mutante 3B5.2 cadeia leve variável resultante é a seguinte, os aminoácidos mutantes estão em negrito e com duplo sublinhado: QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSSASSRVS YVHWYQQKSG TSPKRWLYDT SNLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW STNPPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 419).

A capacidade de ambos o anticorpo 3B5.2 e a variante de anticorpo 3B5.2 para ligar a proteína de Sp35 foi a mesma quando testada. Além disso, com base em dados de mobilidade electroforética, verifica-se que a cadeia leve variável 3B5.2 é glicosilada, enquanto a cadeia leve variante não é. Finalmente, os níveis de expressão de ambos os anticorpos em células transfectadas foram os mesmos.

EXEMPLO 17

Construção do anticorpo 1A7 humanizado

SEQUÊNCIAS DE CADEIAS LEVES E PESADAS 1A7

Cadeia leve:

```
1  QVLTOSP AI MSASPGEKVT MTCS SS SYHWYQOKS  
GTSPKRW YD 50  
51  SKKLASGVPA RFS SGSGTS SLTISSMEA EDAATYYC Q  
WSSNEFTFGS 100  
101 GTKLEIK (SEQ ID NO:283)
```

Cadeia pesada:

```
1  QVOLVQSGPE LKKPGETVKI SCKAS SYTET NYGNWVKQA  
PGKGLKWMGW 50  
51  INEDT EPTYT EDFQGRFAPS LETSASTVYL QFNNLKNE DTATY  
FCAB EGVHF 100  
101 DYWGQGT TTVT VSS (SEQ ID NO 170)
```

Sublinhado negrito: Resíduos Kabat CDR

Sublinhado itálico: Resíduos Chotia CDR

Resíduos canônicos

Numeração de acordo com o esquema de Kabat

ANÁLISE DAS REGIÕES VARIÁVEIS MURINAS

As regiões de determinação de complementaridade (CDRs) contêm os resíduos com maior probabilidade de se ligarem ao antigénio e deve ser mantida no anticorpo remodelado. As CDR são definidos por sequência de acordo com Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5ª Edição, U.S. Dept. Health and Human Services. U.S. Govt. Printing Office. Os CDRs caem no âmbito das classes canônicas (Chothia, C., Lesk, AM, Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, SJ, ar, G., Xerife, S., Padlan, EA, Davies, D., Tulipa, WR, Colman, PM, Spinelli, S., Alzari, PM e Poljak, R. J. (1989) Nature 342:877-883) em que os resíduos chave determinam em grande medida, a conformação estrutural do

circuito CDR. Estes resíduos são quase sempre retidas no anticorpo remodelado. As CDRs de cadeia pesada e leve foram classificados em classes canônicas como se segue:

Cadeia leve			Cadeia pesada		
L1:	10 resíduos	Classe 1	H1:	5 resíduos	Classe 1
L2:	7 resíduos	Classe 1	H2:	17 resíduos	Classe 2
L3:	9 resíduos	Classe 1	H3:	7 resíduos	Sem classe canônica

Os resíduos canônicos importantes para estas classes de CDR são indicados na Tabela 10.

Tabela 10

L1	Clas 1	2(I)	25(A)	30(V)	33(M)	71(Y)
L2	Clase 1	48(I)	51(T)	52(S)	64(G)	
L3	Clase 1	90(Q)	95(P)			
H1	Clase 1	24(A)	26(G)	27(F)	29(F)	34(M), 94(R)
H2	Clase 2	52a(T)	55(G)	71(L)		
H3	Sem classe canônica					

As cadeias leve e pesada variáveis foram comparadas com o consenso (Kabat et al, 1991) e as sequências de linhas germinais (Brensing-Kuppers J, Zocher I, Thiebe R, Zachau HG. (1997). Gene. 191 (2) :173-81 e Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T. (1998) J Exp Med. 188 (11) :2151-62) para subgrupos murino e humano usando o programa BLAST e bases de dados de sequências de proteínas de BLAST de consensos e de linhaem germinal internamente compilados.

A cadeia leve variável é um membro do subgrupo Kappa murino 6 com uma identidade de 94% em 109 aminoácidos de sobreposição e originados de germinativas de kk4 murino (100% ID) (Veja abaixo)

> mukk4

Pesquisa: 1

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPR
60

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPR
Sbjct: 1

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPR
60

Pesquisa: 61 FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP 94 (SEQ ID
NO:451)

FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP (SEQ ID
NO:451)

Sbjct: 61 FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP 94 (SEQ ID
NO:451)

A cadeia variável pesada é um membro do subgrupo murino HVMS
com uma identidade de 55% em 132 sobreposição de aminoácidos
e originárias da linha germinal VGK6 murina (ID 92%) (ver
abaixo)

> muVGK6

Pesquisa: 1

QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFITNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTDTGEPTY
60

Q+QLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFITNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINT+TGEPTY
Sbjct: 1

QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFITNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTDTGEPTY
60

Pesquisa: 61 TEDFQGRFAFSLETSASTVYLQFNNLNKEDTATYFC 96 (SEQ ID
NO:452)

+DF+GRFAFSLETSAST YLQ NNLKNEDTATYFC (SEQ ID
NO:453)

Sbjct: 61 ADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLNKEDTATYFC 96 (SEQ ID
NO:454)

A cadeia leve variável corresponde a um Kappa de subgrupo
humano 3 com 67% de identidade com com uma identidade de 67%

em 109 sobreposição de aminoácidos e é o mais próximo da linha germinativa L6 humano (64% ID (Ver abaixo))

> huL6

Pesquisa: 1

QIVLTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSK LASGVPA

59 + IVLTQSPA +S SPGE+ T++C AS SVS Y+ WYQQK G +P+ IYD

S A+G+PA

Sbjct: 1

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRATGIPA

60

Pesquisa: 60 RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP 94 (SEQ ID NO : 455)

RFSGSGSGT ++LTISS+E ED A YYCQQ S+ P (SEQ ID

NO : 456)

Sbjct: 61 RFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWP 95 (SEQ ID NO : 457)

A cadeia pesada variável corresponde ao subgrupo humano MHV1 com uma identificação de 59% numa sobreposição 129 aa e é o mais próximo a linha de germes huVH7-81 humano (70% ID) (ver abaixo)

> huVH7-81

Pesquisa: 1

QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTDTGEPTY

60

QVQLVQSG E+K+PG +VK+SCKASGY+FT YGMNWV QAPG+GL+WMGW

NT TG PTY

Sbjct: 1

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYSFTTYGMNWVPQAPGQGLEWMGWFNTYTGNPTY

60

Pesquisa: 61 TEDFQGRFAFSLETSASTVYLQFNNLKNEDTATYFCAR 98 (SEQ
ID NO:458)

+ F GRF FS++TSAST YLQ ++LK ED A Y+CAR (SEQ

ID

NO:459)

Sbjct: 61 AQG FTGRFVFSMDTSAS TAYLQISSLKAEDMAMYYCAR 98 (SEQ ID
NO:460)

MODELAÇÃO DE ESTRUTURA DAS REGIÕES VARIÁVEIS

Para essa humanização construímos o modelo de regiões variáveis PlA7 com base nas estruturas cristalinas de anticorpos OKT3 (PDB ID 1SY6 - usado para modelagem de cadeia leve) e TE33 (PDB ID 1TET - usado para modelagem de cadeia pesada).

ANÁLISE DAS REGIÕES VARIÁVEIS REFORMULADAS

Tentamos encontrar as sequências de anticorpos humanos expressas mais similares, que não precisam ser retromutadas nas posições (L4 ,38,43,44,58,62,65-69, 73, 85, 98 e H2, 4,36,39,43,45,69,70,74,92) (ver, por exemplo, a Patente dos EUA No. 6,407,213), e usá-los como os quadros de anticorpos.

Foi utilizado o banco de dados de sequência de anticorpos de cura interna e ferramentas de consulta para identificar modelos adequados que têm a maior similaridade com as sequências PlA7 murino em canônica, interface e zona de resíduos de verniz para minimizar o número de retromutações. Sequências germinativas preenchidos com consenso de resíduos na região FR4 foram considerados separadamente. Depois de várias estruturas terem sido consideradas, sequências germinais huL6 e VH7-81 foram selecionados como estruturas aceitadoras para as cadeias pesadas e leves, respectivamente.

Três versões da cadeia de reformulação de luz variável e três versões da cadeia pesada reformulada variável foram concebidas. A primeira versão contém o menor número de retromutações e a terceira versão contém a maior parte (isto é, o menos "humanizado").

RETROMUTAÇÃO EM VL REFORMULADA

huL6

E1Q Ponto Q1 para antígeno e a mudança de carga pode alterar a ligação. Presente na versão 2 e 3

L46R R46 é um resíduo invulgar na interface VH/VL, que suporta CDR-L1 e CDR-H3. Presente em todas as versões

L47W - W47 está localizado em um cluster por baixo de CDR-L2. Presente apenas na versão 3

I58V - V58 está localizado num cluster por baixo de CDR-L2.
Presente apenas na versão 3

F71Y - Y71 é um resíduo canônico importante para apoiar CDR-L1 e CDR-L3.

Presente em todas as versões

RETROMUTAÇÕES EM VH REFORMULADO

huVH7-81

P38K K38 suporta CDR-H2. Presente nas versões 2 e 3.

E46K K46 suporta CDR-H2. Presente nas versões 2 e 3

M71L L71 é um resíduo canônico que suporta CDR-H1. Presente em todas as versões

A78V V78 é hipermutada de linha germinal A e suporta CDR-H1

I82F F82 é um resíduo de embalagem principal. Presente na versão 3 apenas

Y91F F91 é um resíduo na interface VH/VL. Presente na versão 3 apenas

CONCEPÇÕES DE HUMANIZAÇÃO P1A7

Quadro feito a partir de sequências:

Cadeia de luz: huL6

Cadeia pesada: huVH7-81

As retromutações estão em minúsculas a negrito

As CDRs estão sublinhadas

> variante de cadeia leve 1

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQOKPGQAPRrLIYDTSKLASGIPAR
FSGSGSGTDyTLTISSLEPEDFAVYYCQOWSSNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:430)

> variante de cadeia leve 2

qIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQOKPGQAPRrLIYDTSKLASGIPAR
FSGSGSGTDyTLTISSLEPEDFAVYYCQOWSSNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:431)

> variante de cadeia leve 3

qIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQOKPGQAPRrwiYDTSKLASGvPAR
FSGSGSCTDyTLTISSLEPEDFAVYYCQOWSSNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:471)

> variante pesada 1

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVPQAPGQGLEWMGWINTDTGEPTY
TEDFQGRFVFSIDTSASTvYLQISSLKAEDMAMYYCAREGVHFDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:472)

> variante pesada 2

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVkQAPGQGLkWMGWINTDTGEPTY
TEDFQGRFVFSIDTSASTvYLQISSLKAEDMAMYYCAREGVHFDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:432)

> variante pesada 3

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVkQAPGQGLkWMGWINTDTGEPTY
TEDFQGRFVFSIDTSASTvYLQfSSLKAEDMAMYfCAREGVHFDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:473)

- POLIPEPTÍDEO COMPRIMENTO COMPLETO E SEQUÊNCIA DE CADEIA
PESADA POLINUCLEOTÍDICA PARA **Variante pesada 2**

Sequência de ADN de cadeia pesada huP1A7-IgG1 H2 (pXW465)

1 ATGGA CTGGA CCTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG
CACCAGGTGC

51 CCACTCCCAG GTCCA ACTGG TACAGTCTGG ACACGAGGTG
AAGCAGCCTG

101 GAGCATCAGT CAAGGTCTCC TGCAAGGCCT CTGGGTATAC
CTTCACAAAC

151 TATGGAATGA ACTGGGTGAA GCAGGCTCCT GGACAAGGTT
TAAAGTGGAT

201 GGGCTGGATA AACACCGACA CTGGAGAGCC AACATATACT
GAAGATTTC

251 AGGGACGGTT TGTCTTCTCT TTGGACACCT CTGCCAGCAC
TGTTTATTTG

301 CAGATCAGCA GCCTCAAAGC TGAGGACATG GCAATGTATT
ACTGTGCAAG

351 AGAGGGGGTC CACTTTGACT ACTGGGGCCA AGGGACCCTT
GTCACCGTCT

401 CCTCAGCCTC CACCAAGGGC CCATCGGTCT TCCCCCTGGC
ACCCTCCTCC

451 AAGAGCACCT CTGGGGGGCAC AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG
TCAAGGACTA

501 CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC
CTGACCAGCG

551 GCGTGCACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT
CTACTCCCTC

601 AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACCC
AGACCTACAT

651 CTGCAACGTG AATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC
AAGAAAGTTG

701 AGCCCAAATC TTGTGACAAG ACTCACACAT GCCCACCCTG
CCCAGCACCT

751 GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCC
AACCCAAGGA

801 CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG
GTGGTGGACG

851 TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT
GGACGGCGTG

901 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT
ACAACAGCAC

951 GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC
TGGCTGAATG

1001 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC
AGCCCCCATC

1051 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCAGAGAAC
CACAGGTGTA

1101 CACCCTGCCC CCATCCCGGG ATGAGCTGAC CAAGAACCAG
GTCAGCCTGA

1151 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCCAGCG ACATCGCCGT
GGAGTGGGAG

1201 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC
CCGTGTTGGA

1251 CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAA GCTCACCGTG
GACAAGAGCA

1301 GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA
TGAGGCTCTG

1351 CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCCG GTTGA
(SEQ ID NO:461)

Sequência de proteína prevista de cadeia pesada huP1A7 H2 (a
sequência sinal está sublinhada)

1 MDWTWRVFCL LAVAPGAHSQ VQLVQSGHEV KQPGASVKVS
CKASGYTFN

51 YGMNWVKQAP GQGLKWMGWI NTDIGEPTYT EDFQGRFVFS
LDTSASTVYL

101 QISSLKAEDM AMYYCAREGV HFDYWGQGTL VTVSSASTKG
PSVFPLAPSS

151 KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL

201 SSVVTVPPSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK
THTCPPCPAP

251 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
VKFNWYVDGV

301 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
VSNKALPAPI

351 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF
YPSDIAVEWE

401 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
FSCSYMHEAL

451 HNHYTQKSLS LSPG* (SEQ ID NO:462)

POLIPEPTÍDEO COMPRIMENTO COMPLETO E SEQUÊNCIA DE CADEIA
PESADA POLINUCLEOTÍDICA PARA **Variante pesada 1**

Sequência de ADN de huP1A7 L1 cadeia leve kappa (pXW480)

1 ATGGATT TTC AGG TTCAGAT TTCAGCTTC CTGCTAATCA
GTGCCTCAGT

51 CATAATATCC AGAGGAGAAA TTGTTCTCAC CCAGTCTCCA
GCAACCTTGT

101 CTTTATCTCC AGGGGAGAGA GCCACCTTGT CCTGCAGTGC
CAGCTCAAGT

151 GTAAGTTACA TGCACTGGTA CCAGCAGAAG CCAGGCCAAG
CGCCCAGAAG

201 ACTGATTTAT GACACATCCA AACTGGCTTC TGGAATCCCT
GCTCGCTTCA

251 GTGGCAGTGG GTCTGGGACC GATTACACTC TCACCATCAG
CAGCTTGGAG

301 CCTGAAGATT TCGCCGTTTA TTA CTGCCAG CAGTGGAGTA
GTAACCCATT

351 CACGTTTCGGC CAGGGGACAA AGGTGGAAAT AAAACGTACG
GTGGCTGCAC

401 CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA
ATCTGGAACT

451 GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAG
AGGCCAAAGT

501 ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC
CAGGAGAGTG

551 TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG
CAGCACCTG

601 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG
CCTGCGAAGT

651 CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC
AACAGGGGAG

701 AGTGTTAG (SEQ ID NO:463)

Sequência de proteína prevista de cadeia leve huP1A7 L1
(sequência de sinal está sublinhado)

1 MDFQVQIFSF LLISASVIIS RGEIVLTQSP ATLSLSPGER ATLSCSASSS
51 VSYMHWYQQK PGQAPRRLIY DTSKLAGIP ARFSGSGSGT DYTLTISSE
101 PEDFAVYYCQ QWSSNPFTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT

151 **ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK
DSTYLSSTL**
201 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC * (SEQ ID NO: 464)

POLIPEPTÍDEO COMPRIMENTO COMPLETO E SEQUÊNCIA DE CADEIA
PESADA POLINUCLEOTÍDICA PARA **Variante leve 2**

Sequência de ADN de huP1A7 L2 cadeia leve kappa (pXW476)

1 ATGGATTTTC AGGTCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA
GTGCCTCAGT

51 CATAATATCC AGAGGACAAA TTGTTCTCAC CCAGTCTCCA
GCAACCTTGT

101 CTTTATCTCC AGGGGAGAGA GCCACCTTGT CCTGCAGTGC
CAGCTCAAGT

151 GTAAGTTACA TGCACCTGGTA CCAGCAGAAG CCAGGCCAAG
CGCCCAGAAG

201 ACTGATTTAT GACACATCCA AACTGGCTTC TGGAATCCCT
GCTCGCTTCA

251 GTGGCAGTGG GTCTGGGACC GATTACACTC TCACCATCAG
CAGCTTGGAG

301 CCTGAAGATT TCGCCGTTTA TTACTGCCAG CAGTGGAGTA
GTAACCCATT

351 CACGTTTCGGC CAGGGGACAA AGGTGGAAAT AAAACGTACG
GTGGCTGCAC

401 CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA
ATCTGGAAC

451 GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAG
AGGCCAAAGT

501 ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC
CAGGAGAGTG

551 TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG
CAGCACCTG

601 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG
CCTGCGAAGT

651 CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC
AACAGGGGAG

701 AGTGTTAG (SEQ ID NO:465)

Sequência de proteína prevista de cadeia leve huP1A7 L2(o
sinal de sequência está sublinhado)

1 MDFQVQIFSF LLISASVIIS RGQIVLTQSP ATLSLSPGER ATLSCSASSS
51 VSYMHWYQQK PGQAPRRLIY DTSKLAGIP ARFSGSGSGT DYTLTISSLE
101 PEDFAVYYCQ QWSSNPFTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT
151 ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK
DSTYSLSTL
201 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC* (SEQ ID NOS:466)

Sequência de polinucleotídeo e polipeptídeo de cadeia leve e
pesada de um anticorpo 1A7 quimérico humano e murino como se
segue:

A sequência de ADN de cadeia leve Kappa chP1A7 (pEAG2110)

1 ATGGATTTTC AGGTGCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA
GTGCCTCAGT

51 CATAATATCC AGAGGACAAA TTGTTCTCAC CCAGTCTCCA
GCAATCATGT

101 CTGCATCTCC AGGGGAGAAG GTCACCATGA CCTGCAGTGC
CAGCTCAAGT

151 GTAAGTTACA TGCACTGGTA CCAGCAGAAG TCAGGCACCT
CCCCCAAAG

201 ATGGATTTAT GACACATCCA AACTGGCTTC TGGAGTCCCT
GCTCGCTTCA

251 GTGGCAGTGG GTCTGGGACC TCTTACTCTC TCACAATCAG
CAGCATGGAG

301 GCTGAAGATG CTGCCACTTA TTA CTGCCAG CAGTGGAGTA
GTAACCCATT

351 CACGTTTCGGC TCGGGGACAA AGTTGGAAAT AAAACGTACG
GTGGCTGCAC

401 CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA
ATCTGGAACT

451 GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAG
AGGCCAAAGT

501 ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC
CAGGAGAGTG

551 TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG
CAGCACCTG

601 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG
CCTGCGAAGT

651 CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC
AACAGGGGAG

701 AGTGTTAG (SEQ ID NO:467)

A sequência de proteína previsível de cadeia leve chP1A7
(sequência de sinal está sublinhada)

1 MDFQVOIEFS LLISASVHS RGQIVLTQSP AIMSASPGEK VTMTCSASSS
 51 VSYMHWYQQK SGTSPKRWIY DTSKLASGVP ARFSGSGSGT
 SYSLTISSME
 101 AEDAATYYCQ QWSSNPFTFG SGTKLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT
 151 ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK
 DSTYSLSSTL
 201 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC* (SEQ ID NO:468)

A sequência de ADN de cadeia pesada chP1A7 huIgG1 (pEAG2112)

1 ATGGA CTGGA CCTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG
 CACCAGGTGC
 51 CCACTCCCAG GTCCA ACTGG TACAGTCTGG ACCTGAGCTG
 AAGAAGCCTG
 101 GAGAGACAGT CAAGATCTCC TGCAAGGCCT CTGGGTATAC
 CTTCAAAAC
 151 TATGGAATGA ACTGGGTGAA GCAGGCTCCA GGAAAGGGTT
 TAAAGTGGAT
 201 GGGCTGGATA AACACCGACA CTGGAGAGCC AACATATACT
 GAAGATTTC
 251 AGGGACGGTT TGCCTTCTCT TTGGAAACCT CTGCCAGCAC
 TGTTTATTTG
 301 CAGTTCAACA ACCTCAAAA TGAGGACACG GCTACATATT
 TCTGTGCAAG
 351 AGAGGGGGTC CACTTTGACT ACTGGGGCCA AGGGACCACG
 GTCACCGTCT

401 CCTCAGCCTC CACCAAGGGC CCATCGGTCT TCCCCCTGGC
ACCCTCCTCC

451 AAGAGCACCT CTGGGGGGCAC AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG
TCAAGGACTA

501 CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC
CTGACCAGCG

551 GCGTGCACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT
CTACTCCCTC

601 AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACCC
AGACCTACAT

651 CTGCAACGTG AATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC
AAGAAAGTTG

701 AGCCCAAATC TTGTGACAAG ACTCACACAT GCCCACC GTG
CCCAGCACCT

751 GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCCCAA
AACCCAAGGA

801 CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG
GTGGTGGACG

851 TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT
GGACGGCGTG

901 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT
ACAACAGCAC

951 GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC
TGGCTGAATG

1001 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC
AGCCCCCATC

1051 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCAGAGAAC
CACAGGTGTA

1101 CACCCTGCCC CCATCCCGGG ATGAGCTGAC CAAGAACCAG
GTCAGCCTGA

1151 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCCAGCG ACATCGCCGT
GGAGTGGGAG

1201 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC
CCGTGTTGGA

1251 CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAA GCTCACCGTG
GACAAGAGCA

1301 GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA
TGAGGCTCTG

1351 CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCCG GTTGA
(SEQ ID NO:469)

Sequência de proteína previsível de cadeia pesada chP1A7
(sequência de sinal está sublinhada)

1 MDWTWRVFCL LAVAPGAHSQ VQLVQSGPEL KKPGETVKIS
CKASGYFTFN

51 YGMNWWVKQAP GKGLKWMGWI NTDGTGEPTYT EDFQGRFAFS
LETSASTVYL

101 QFNNLKNEDT ATYFCAREGV HFDYWGQGTT VTVSSASTKG
PSVFPLAPSS

151 KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL

201 SSVVTVPPSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK
THTCPPCPAP

251 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
VKFNWYVDGV

301 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
VSNKALPAPI

351 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF
YPSDIAVEWE

401 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
FSCSVMHEAL

451 HNHYTQKSL S LSPG* (SEQ ID NO:470)

EXEMPLO 18

Reengenharia de Li33Ig2 para reduzir função efetora, glicação e agregação

Várias mutações foram feitas em Li33, a fim de reduzir potencialmente função efetora, glicação e agregação. O efeito de cada uma destas mutações na expressão da proteína, solubilidade, actividade de anticorpo no ensaio de oligodendrócito-DRG de co-cultura, e glicação ou ligação de CD32 foi determinada. Os resultados estão resumidos a seguir na Tabela 11.

TABELA 11: REENGENHARIA LI33IG2

Função efetora	Construção expressa	Solubilidade (mg/ml)	Ligação de CD32 de IC50 (µg/ml)	Ensaio de atividade (cocultura)
Li33Ig2wt	S	>20	4.3	+
Li33Ig2 agly	S	0.3	25	+
Li33Ig2 Rinat	S	>5	9.5	+
Li33Ig2 PDL	S	5.8	>100	+
Li33Ig2 Alexion	Em curso	ND	ND	ND
Glicação	Construção Expressa	Solubilidade (mg/mL)	% Glicação	Ensaio de atividade (Cocultura)
Li33wt	S	>20	25	+
Li33Ig2 PDL	S	5.8	15 (5)	+
Li33Ig2 PDLW94G	S	ND	>2	-

(continuação)

Glicação	Construção expressa	Solubilidade (mg/mL)	% de Glicação	Ensaio de atividade (cocultura)
Li33Ig2 PDLW94V	S	ND	<2	+
Li33Ig2 PDLW94Q	S	ND	<2	-
Li33Ig2 PDLW93N	S	ND	<2	-
Li33Ig2 PDLK93R	S	0,4	<2	+
Agregação	Construção expressa	Solubilidade (mg/mL)	% de Glicação	Ensaio de atividade (cocultura)
Li33Ig1a94V 157P	S	ND	ND	+
Li33Ig1a94V 157S	S	ND	ND	-
Li33Ig1a94V 157T	S	ND	ND	+
Li33Ig1a94V 157V	S	ND	ND	+
Li33Ig2PDL94V 157S	S	ND	ND	+
Li33Ig2PDL94V 157A	S	ND	ND	+
Li33Ig2PDL94V W103Q	S	ND	ND	-
Li33Ig2PDL94V W103A	S	ND	ND	-
Li33Ig2PDL94V 103Q57S	S	ND	<2	+
Li33Ig2PDL94V 103Q57A	S	ND	<2	+

EXEMPLO 19

Construção de uma variante de Li81

Anticorpo Li81 é uma versão maturada de afinidade de anticorpo Li13. Uma versão glicosilada do anticorpo Li81 foi criado pela mudança de um único aminoácido na sequência da cadeia pesada Li81. O seguinte é a sequência de aminoácidos para a cadeia pesada variável (VH) da variante aglicosilada.

MDWTWRFCLLAVAPGAHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
 FTFSAYEMKWVRQAPGKGLEWVSVIGPSGGFTFYADSVKGRFTISR
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEGDNDAFDIWGQGTTVTVSSA
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
 NO: 474)

A sequência de comando (os primeiros 19 aminoácidos), que não
 irá estar presente na proteína madura, é mostrada a negrito,
 e os CDRSs estão sublinhadas. A alteração de um único
 aminoácido em comparação com a sequência de cadeia pesada de
 Li81 variável (SEQ ID NO: 433) é mostrada em negrito e
 sublinhado duplo. O seguinte é a sequência de nucleótidos
 para a cadeia pesada variável (VH) da variante aglicosilada.

GAAGTACAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCTGGTG
 GTTCTTTACGTCCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTGCTT
 ACGAGATGAAGTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGT
 GGGTTTCTGTTATCGGTCCTTCTGGTGGCTTTACTTTTTATGCTGAC
 TCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATA
 CTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGT
 GTATTACTGTGCAACAGAGGGTGATAATGATGCTTTTGATATCTGG
 GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGC
 CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG
 GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
 GGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
 CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC

AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGT
GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC
CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGAGGATCCCTGCCCCG (SEQ ID
NO:450).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Biogen Idee MA Inc.
 <120> ANTICORPOS DE SP35 E USOS DOS MESMOS
 <130> 2159.128PC01
 <150> US 60/879,324
 <151> 2007-01-09
 <160> 474
 <170> Patentln versão 3.3
 <210> 1
 <211> 1845
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

atgctggcgg	ggggcgtag	gagcatgcc	agccccctcc	tggcctgctg	gcagcccatc	60
ctcctgctgg	tgtctgggctc	agtgtgtgtca	ggctcggcca	cgggctgccc	gccccgctgc	120
gagtgtctcg	cccaggaccg	cgctgtgctg	tgccaccgca	agcgctttgt	ggcagtcctc	180
gagggcatcc	ccaccgagac	gcgcctgctg	gacctaggca	agaaccgcat	caaaacgctc	240
aaccaggacg	agttcgccag	cttcccgcac	ctggaggagc	tggagctcaa	cgagaacatc	300
gtgagcgccg	tggagcccgg	cgcttcaac	aacctcttca	acctccggac	gctgggtctc	360
cgcagcaacc	gcctgaagct	catcccgcta	ggcgtcttca	ctggcctcag	caacctgacc	420
aagctggaca	tcagcgagaa	caagattgtt	atcctgctgg	actacatgtt	tcaggacctg	480
tacaacctca	agtactgga	ggttggcgac	aatgacctcg	tctacatctc	tcaccgcgcc	540
ttcagcggcc	tcaacagcct	ggagcagctg	acgctggaga	aatgcaacct	gacctccatc	600
cccaccgagg	cgctgtccca	cctgcacggc	ctcatcgtcc	tgaggctccg	gcacctcaac	660
atcaatgcca	tccgggacta	ctccttcaag	aggctctacc	gactcaaggt	cttgagatc	720
tcccactggc	cctacttgga	caccatgaca	cccaactgcc	tctacggcct	caacctgacg	780
tccctgtcca	tcacacactg	caatctgacc	gctgtgccct	acctggccgt	ccgccacctc	840
gtctatctcc	gcttctctca	cctctcctac	aaccccatca	gcaccattga	gggtcccatg	900
ttgcatgagc	tgtctcggct	gcaggagatc	cagctgggtg	gcgggcagct	ggccgtggtg	960
gagccctatg	ccttcgcggg	cctcaactac	ctgcgcgtgc	tcaatgtctc	tggcaaccag	
1020						
ctgaccacac	tggaggaatc	agtcttccac	tcggtgggca	acctggagac	actcatcctg	
1080						
gactccaacc	cgctggcctg	cgactqtcgg	ctcctgtggg	tgttcggcg	ccgctggcgg	
1140						
ctcaacttca	accggcagca	gccacgtgc	gccacgccc	agtttgtcca	gggcaaggag	
1200						
ttcaaggact	tccctgatgt	gctactgccc	aactacttca	cctgccgccg	cgcccgcatc	
1260						
cgggaccgca	aggcccagca	ggtgtttgtg	gacgagggcc	acacggtgca	gtttgtgtgc	
1320						
cgggccgatg	gcgaccgcc	gcccgccatc	ctctggctct	cacccgaaa	gcacctggtc	
1380						

tcagccaaga	gcaatgggcg	gtcacagtc	ttccctgatg	gcacgctgga	ggtgcgctac
1440					
gcccagggtac	aggacaacgg	cacgtacctg	tgcatacgcg	ccaacgcggg	cggcaacgac
1500					
tccatgcccg	cccacctgca	tgtgcgagc	tactcgcccg	actggcccca	tcagcccaac
1560					
aagaccttcg	ctttcatctc	caaccagccg	ggcgagggag	aggccaacag	caccgcgccc
1620					
actgtgcctt	tccccttcga	catcaagacc	ctcatcatcg	ccaccaccat	gggtttcatc
1680					
tctttcctgg	gcgtcgctct	cttctgcctg	gtgctgctgt	ttctctggag	ccggggcaag
1740					
ggcaacacaa	agcacaacat	cgagatcgag	tatgtgcccc	gaaagtcgga	cgcaggcatc
1800					
agctccgccc	acgcgccccg	caagttcaac	atgaagatga	tatga	
1845					

<210> 2
 <211> 614
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met	Leu	Ala	Gly	Gly	Val	Arg	Ser	Met	Pro	Ser	Pro	Leu	Leu	Ala	Cys
1			5						10					15	
Trp	Gln	Pro	Ile	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Gly	Ser	Val	Leu	Ser	Gly	Ser
			20						25					30	
Ala	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro	Arg	Cys	Glu	Cys	Ser	Ala	Gln	Asp	Arg	Ala
35						40					45				
Val	Leu	Cys	His	Arg	Lys	Arg	Phe	Val	Ala	Val	Pro	Glu	Gly	Ile	Pro
50		55			60										
Thr	Glu	Thr	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Gly	Lys	Asn	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu
65					70					75					80
Asn	Gln	Asp	Glu	Phe	Ala	Ser	Phe	Pro	His	Leu	Glu	Glu	Leu	Glu	Leu
					85					90				95	
Asn	Glu	Asn	Ile	Val	Ser	Ala	Val	Glu	Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Asn	Leu
					100					105				110	
Phe	Asn	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Asn	Arg	Leu	Lys	Leu	Ile
115					120					125					
Pro	Leu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Lys	Leu	Asp	Ile
130					135					140					
Ser	Glu	Asn	Lys	Ile	Val	Ile	Leu	Leu	Asp	Tyr	Met	Phe	Gln	Asp	Leu
145					150					155				160	
Tyr	Asn	Leu	Lys	Ser	Leu	Glu	Val	Gly	Asp	Asn	Asp	Leu	Val	Tyr	Ile
165					170					175					
Ser	His	Arg	Ala	Phe	Ser	Gly	Leu	Asn	Ser	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Leu

180		185		190
Glu Lys Cys Asn Leu	Thr Ser Ile Pro Thr	Glu Ala Leu Ser His Leu		
195		200		205
His Gly Leu Ile Val	Leu Arg Leu Arg His	Leu Asn Ile Asn Ala Ile		
210		215		220
Arg Asp Tyr Ser Phe	Lys Arg Leu Tyr Arg	Leu Lys Val Leu Glu Ile		
225		230		235
				240
Ser His Trp Pro Tyr	Leu Asp Thr Met Thr	Pro Asn Cys Leu Tyr Gly		
245		250		255
Leu Asn Leu Thr Ser	Leu Ser Ile Thr His	Cys Asn Leu Thr Ala Val		
260		265		270
Pro Tyr Leu Ala Val	Arg His Leu Val Tyr	Leu Arg Phe Leu Asn Leu		
275		280		285
Ser Tyr Asn Pro Ile	Ser Thr Ile Glu Gly	Ser Met Leu His Glu Leu		
290		295		300
Leu Arg Leu Gln Glu	Ile Gln Leu Val Gly	Gly Gln Leu Ala Val Val		
305		310		315
				320
Glu Pro Tyr Ala Phe	Arg Gly Leu Asn Tyr	Leu Arg Val Leu Asn Val		
325		330		335
Ser Gly Asn Gln Leu	Thr Thr Leu Glu Glu	Ser Val Phe His Ser Val		
340		345		350
Gly Asn Leu Glu Thr	Leu Ile Leu Asp Ser	Asn Pro Leu Ala Cys Asp		
355		360		365
Cys Arg Leu Leu Trp	Val Phe Arg Arg Arg	Trp Arg Leu Asn Phe Asn		
370		375		380
Arg Gln Gln Pro Thr	Cys Ala Thr Pro Glu	Phe Val Gln Gly Lys Glu		
385		390		395
				400
Phe Lys Asp Phe Pro	Asp Val Leu Leu Pro	Asn Tyr Phe Thr Cys Arg		
405		410		415
Arg Ala Arg Ile Arg	Asp Arg Lys Ala Gln	Gln Val Phe Val Asp Glu		
420		425		430
Gly His Thr Val Gln	Phe Val Cys Arg Ala	Asp Gly Asp Pro Pro Pro		
435		440		445
Ala Ile Leu Trp Leu	Ser Pro Arg Lys His	Leu Val Ser Ala Lys Ser		
450		455		460
Asn Gly Arg Leu Thr	Val Phe Pro Asp Gly	Thr Leu Glu Val Arg Tyr		
465		470		475
				480
Ala Gln Val Gln Asp	Asn Gly Thr Tyr Leu	Cys Ile Ala Ala Asn Ala		
485		490		495
Gly Gly Asn Asp Ser	Met Pro Ala His Leu	His Val Arg Ser Tyr Ser		
500		505		510
Pro Asp Trp Pro His	Gln Pro Asn Lys Thr	Phe Ala Phe Ile Ser Asn		
515		520		525
Gln Pro Gly Glu Gly	Glu Ala Asn Ser Thr	Arg Ala Thr Val Pro Phe		
530		535		540
Pro Phe Asp Ile Lys	Thr Leu Ile Ile Ala	Thr Thr Met Gly Phe Ile		

1 5

<210> 7
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lil0 que codifica VH-CRD2

<400> 7
 tggatcggtc cttctggtgg cgttactgct tatgctgact 51

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lil0 que codifica VH-CRD2

<400> 8

Trp Ile Gly Pro Ser Gly Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lil0 que codifica VH-CDR3

<400> 9
 ccctatagca gtggctggtg ggacttcgat ctc 33

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lil0 que codifica VH-CDR3

<400> 10

Pro Tyr Ser Ser Gly Trp Trp Asp Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VH-CDR1

<400> 11

atgtacttta tgggt 15

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VH-CDR1

<400> 12

Met Tyr Phe Met Gly

1 5

<210> 13

<211> 51

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VH-CDR2

<400> 13

tctatctctc cttctggtgg ctttacttct tatgctgact ccgttaaagg t 51

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VH-CDR2

<400> 14

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1	5	10	15	

Gly

<210> 15

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VH-CDR3

<400> 15

gatcggcatg cttttgatat c 21

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VH-CDR3

<400> 16

Asp Arg His Ala Phe Asp Ile

1	5	

<210> 17

<211> 14

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li05 que codifica VH-CDR1

<400> 17

cttacgctat ggggt 14

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li05 que codifica VH

<400> 18

Ala Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 19

<211> 51

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li05 que codifica VH-CDR2

<400> 19

tctatcggtt cttctgggtg ctatactgat tatgctgact ccgttaaagg t 51

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li05 que codifica VH-CDR2

<400> 20

Ser Ile Val Ser Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li05que codifica VH-CDR3

<400> 21

gagggtgacc ataatgcttt tgatatc 27

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li05que codifica VH-CDR3

<400> 22
 Glu Gly Asp His Asn Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 23
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lillque codifica VH-CDR1

<400> 23
 tcttacgcta tgtat 15

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lillque codifica VH-CDR1

<400> 24
 Ser Tyr Ala Met Tyr
 1 5

<210> 25
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lill que codifica VH-CDR2

<400> 25
 tctatctcta cttctggtgg ctatactggt tatgctgact ccgttaaagg t 51

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lill que codifica VH-CDR2

<400> 26
Ser Ile Ser Thr Ser Gly Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 27
<211> 36
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Lillque codifica VH-CDR3

<400> 27
gataccagcg ataatgacta ctactacatg gacgtc 36

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Lill quecodifica VH-CDR3

<400> 28
Asp Thr Ser Asp Asn Asp Tyr Tyr Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 28
<211> 15
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VH-CDR1

<400> 29
aagtaccaga tgact 15

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VH-CDR1

<400> 30

Lys Tyr Gln Met Thr

1 5

<210> 31

<211> 51

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VH-CDR2

<400> 31

tctatctatc cttctggtggcaatactgtt tatgctgact ccgttaaagg t 51

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VH-CDR2

<400> 32

Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VH-CDR3

<400> 33

gggactacag aggcagtctt tgactac 27

<210> 34

<211> 9

<212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VH-CDR3

 <400> 34
 Gly Thr Thr Glu Ala Val Phe Asp Tyr
 1 5

 <210> 35
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lil2 que codifica VH-CDR1

 <400> 35
 cagtacaata tgttt 15

 <210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lil2 que codifica VH-CDR1

 <400> 36
 Gln Tyr Asn Met Phe
 1 5

 <210> 37
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lil2 que codifica VH-CDR2

 <400> 37
 cgtatctctt cttctggtgg catgactatg tatgctgact ccgttaaagg t 51

 <210> 38
 <211> 17

<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Lil2 que codifica VH-CDR2

<400> 38
Arg Ile Ser Ser Ser Gly Gly Met Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 39
<211> 69
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Lil2 que codifica VH-CDR3

<400> 39
gaagcggttac ggccttattg tagtggtggt agctgctact ccgactacta ctactacggt 60
atggacgtc 69

<210> 40
<211> 23
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Lil2 que codifica VH-CDR3

<400> 40
Glu Ala Leu Arg Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Asp Tyr
1 5 10 15

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 41
<211> 15
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VH-CDR1

<400> 41

gagtacccta tggat

15

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VH-CDR1

<400> 42

Glu Tyr Pro Met Asp

1

5

<210> 43
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VH

 <400> 43
 tctatctatt cttctggtgg ctctactgtt tatgctgact ccattaaagg t 51

 <210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VH-CDR2

 <400> 44

 Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Val Tyr Ala Asp Ser Ile Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 45
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VH-CDR3

 <400> 45
 gaggggtgact ctgatgcttt tgatatc 27

 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VH-CDR3

 <400> 46

Glu Gly Asp Ser Asp Ala Phe Asp Ile

1 5

<210> 47

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VH-CDR1

<400> 47

cattacgaga tgggtt 15

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VH-CDR1

<400> 48

His Tyr Glu Met Val

1 5

<210> 49

<211> 51

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VH-CDR2

<400> 49

tctatccgtt cttctggtgg cgctactaag tatgctgact ccgttaaagg t 51

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VH-CDR2

<400> 50
 Ser Ile Arg Ser Ser Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 51
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VH-CDR3

<400> 51
 gagtcgccag acgactactt tgactac 27

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VH-CDR3

<400> 52
 Glu Ser Pro Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 53
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li03 que codifica VH-CDR1

<400> 53
 Cagtacccta tggag 15

<210> 54
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li03 que codifica VH

<400> 54
 Gln Tyr Pro Met Glu
 1 5

<210> 55
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li03 que codifica VH-

<400> 55
 ggtatctatc cttctggtgg ctctactggt tatgctgact ccgttaaagg t 51

<210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li03 que codifica VH-

<400> 56
 Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 57
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li03que codifica VH-CDR3

<400> 57
 gcggggcagt ggctggggga ctttgactac 30

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li03 que codifica VH-CDR3
 <400> 58
 Ala Gly Gln Trp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 59
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VH-CDR1

 <400> 59
 atgtactcta tgggt 15

 <210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VH-CDR1

 <400> 60
 Met Tyr Ser Met Val

 <210> 61
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VH-CDR2

 <400> 61
 tatactctc cttctggtgg caagactatg tatgctgact ccgttaaagg t 51

 <210> 62
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VH-CDR2

<400> 62

Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Lys Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 63

<211> 69

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VH-CDR3

<400> 63

gattcgagac gccggtatta cgatttttgg agtgggtatc acaactacta ctactactac 60
atggacgctc 69

<210> 64

<211> 23

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VH-CDR3

<400> 64

Asp Ser Arg Arg Arg Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr His Asn Tyr

1 5 10 15

Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val

20

<210>

<211>

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li04 que codifica VH-CDR1

<400> 65

cgttacaata tgggt 15

<210> 66

<211> 5

<212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li04 que codifica VH-CDR1

 <400> 66
 Arg Tyr Asn Met Gly
 1 5

 <210> 67
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li04 que codifica VH-CDR2

 <400> 67
 gttatctatc cttctggtgg cgttactcat tatqctgact ccgttaaagg t 51

 <210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li04 que codifica VH-CDR2

 <400> 68
 Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Gly Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 69
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li04 que codifica VH-CDR3

 <400> 69
 tctatagcag atgatgcttt tgatatc 27

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li04 que codifica VH-CDR3

<400> 70
 Ser Ile Ala Asp Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 71
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VH-CDR1

<400> 71
 acttacgaga tgatt

15

<210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VH-CDR1

<400> 72
 Thr Tyr Glu Met Ile
 1 5

<210> 73
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VH-CDR2

<400> 73
 tctatcggtc cttctggtgg ccttacttgg tatgctgact ccgttaaa

48

<210> 74

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VH-CDR2

 <400> 74
 Ser Ile Gly Pro Ser Gly Gly Leu Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 75
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VH-CDR3

 <400> 75
 atgtattact gtgtacggat tgatgatagt agtgggtggg cttttgatat c 51

 <210> 76
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VH-CDR3

 <400> 76
 Met Tyr Tyr Cys Val Arg Ile Asp Asp Ser Ser Gly Trp Ala Phe Asp
 1 5 10 15

 Ile

 <210> 77
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 1A7 que codifica VH-CDR1

<400> 77
 Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 78
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 1A7 que codifica VH-CDR2

<400> 78
 Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética do anticorpo 1A7 que codifica VH-CDR3

<400> 79
 Glu Gly Val His Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 2F3 que codifica VH-CDR1

<400> 80
 Phe Ser Asp Ala Trp Leu Asp
 1 5

<210> 81
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo 2F3 que codifica VH-CDR2

<400> 81
Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Asn Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 82
<211> 4
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo 2F3 que codifica VH-CDR3

<400> 82
Ser Phe Ala Tyr
1

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo 3P1D10.2C3 ou 3P1E11.3B7 que
codifica VH-CDR1

<400> 83
Ser Ser Trp Thr Gln
1 5

<210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo 3P1D10.2C3 ou 3P1E11.3B7 que
codifica VH-CDR2

<400> 84
Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys

1	5	10	15

Gly

<210> 85
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3P1D10.2C3 ou 3P1E11.3B7 que codifica VH-CDR3

<400> 85
 His Asn Ser Tyr Gly Met Asp Tyr
 1 5

<210> 86
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lilo que codifica VL-CDR1

<400> 86
 cgggcgagtc aggtattgg caactggta gcc 33

<210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lilo que codifica VL-CDR1

<400> 87
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asn Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 88
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lilo que codifica VL-CDR2

<400> 88
gctgcatcca gtttggaaag t 21

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Lilo que codifica VL-CDR2

<400>
Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 90
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Lilo que codifica VL-CDR3

<400> 90
caacaggctc agactttccc gctcacc 27

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Lilo que codifica VL-CDR3

<400> 91
Gln Gln Ala Gln Thr Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 92
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo de anticorpo Li07 que codifica VL-CDR1

<400> 92
tctggagatc agttgggtga caaacatgtg gct 33

<210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VL-CDR1

<400> 93
Ser Gly Asp Gln Leu Gly Asp Lys His Val Ala
1 5 10
<210> 94
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VL-CDR2

<400> 94
ctagacatta agaggcccg c a 21

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VL-CDR2

<400> 95
Leu Asp Ile Lys Arg Pro Ala
1 5

<210> 96
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VL-CDR3

<400> 96
caggcggtggg acatcaagac ggtc 24

<210> 97
<211> 8
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li07 que codifica VL-CDR3

<400> 97
Gln Ala Trp Asp Ile Lys Thr Val
1 5

<210> 98
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li05 que codifica VL-CDR1

<400> 98
gggggagaca acattggaagtaagagtgtc cac 33

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li05que codifica VL-CDR1

<400> 99
Gly Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 100
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li05 que codifica VL-CDR2

<400> 100
gatgattatg i accggccctc a 21

<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li05que codifica VL-CDR2

<400> 101
Asp Asp Tyr Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 102
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li0Sque codifica VL-CDR3

<400> 102
caggtgaggg acagccgtac tgaggaacgg gtg 33

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li05que codifica VL-CDR3

<400> 103
Gln Val Arg Asp Ser Arg Thr Glu Glu Arg Val
1 5 10

<210> 104
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo L111que codifica VL-CDR1

<400> 104
 cgggcgagtc aggagattgc caactactta gcc 33

<210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lillque codifica VL-CDR1

<400> 105
 Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ala Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 106
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lillque codifica VL-CDR2

<400> 106
 gatacatata ctttgcagac t 21

<210> 107
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lillque codifica VL-CDR2

<400> 107
 Asp Thr Tyr Thr Leu Gln Thr
 1 5

<210> 108
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lillque codifica VL-CDR3

<400> 108
 caacaggctg acattttccc gctctct 27

 <210> 109
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lillque codifica VL-CDR3

 <400> 109
 Gln Gln Ala Asp Ile Phe Pro Leu Ser
 1 5

 <210> 110
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li01que codifica VL-CDR1

 <400> 110
 caggcgagtc aggacattagcaactattta aa 32

 <210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VL-CDR1

 <400> 111
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

 <210> 112
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VL-CDR2

<400> 112
gatgcatcca atttggaaca 21

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VL-CDR2

<400> 113
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 114
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VL-CDR3

<400> 114
caacaggctg acagggtccc tgcggtcact 30

<210> 115
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li01 que codifica VL-CDR3

<400> 115
Gln Gln Ala Asp Arg Phe Pro Ala Val Thr
1 5 10

<210> 116
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VL-CDR1

<400> 116
 cgggccagtc agagtattag tagctggttg gcc 33

<210> 117
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VL-CDR1

<400> 117
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 118
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VL-CDR2

<400> 118
 gctgcatcca gtttacgaac t 21

<210> 119
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VL-CDR2

<400> 119
 Ala Ala Ser Ser Leu Arg Thr
 1 5

<210> 120
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VL-CDR3
 <400> 120
 ctacaagatt acagttaccc tctcact 27

 <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li06 que codifica VL-CDR3

 <400> 121
 Leu Gln Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

 <210> 122
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VL-CDR1

 <400> 122
 caggcgagtc aggacattag ttactattta aat 33

 <210> 123
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VL-CDR1

 <400> 123
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr Leu Asn
 1 5 10

 <210> 124
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VL-CDR2

<400> 124
 gatgtatcca atttgcaaac a 21
 <210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VL-CDR2

 <400> 125
 Asp Val Ser Asn Leu Gln Thr
 1 5

 <210> 126
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VL-CDR3

 <400> 126
 caacagtctg ataatctccc tctcact 27

 <210> 127
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li08 que codifica VL-CDR3

 <400> 127
 Gln Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr
 1 5

 <210> 128
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li03 que codifica VL-CDR1

<400> 128
 gggcaagtca gagcattagc agctatttaa at 32

<210> 129
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li03 que codifica VL-CDR1

<400> 129
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 130
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li03 que codifica VL-CDR2

<400> 130
 gctgcatcca gtttgcaaag t 21

<210> 131
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética do anticorpo Li03 que codifica VL-CDR2

<400> 131
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 132
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética do anticorpo Li03 que codifica VL-CDR3

<400> 132
caacagagtt acagtacccc gtggacg 27

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li03 que codifica VL-CDR3

<400> 133
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 134
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VL-CDR1

<400> 134
cgcgcaagtc agagcatcga cacctattta aat 33

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VL-CDR1

<400> 135
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Thr Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 136
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VL-CDR2

<400> 136
 gctgcatcca agttggaaga c 21

<210> 137
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VL-CDR2

<400> 137
 Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp
 1 5

<210> 138
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VL-CDR3

<400> 138
 caacagagtt acagtcccc tctcac 26

<210> 139
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li09 que codifica VL-CDR3

<400> 139
 Gln Gln Ser Tyr Ser Pro Pro Leu Thr
 1 5

<210> 140
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VL-CDR1

<400> 140
tctggagata aattgqggga taaatttgct tcc 33

<210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VL-CDR1

<400> 141
Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala Ser
1 5 10

<210> 142
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VL-CDR2

<400> 142
caagatagga agcgtctctc a 21

<210> 143
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VL-CDR2

<400> 143
Gln Asp Arg Lys Arg Leu Ser
1 5

<210> 144
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li02que codifica VL-CDR3

<400> 144
caggcgtggg acaccaacac tgtgggc

27

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li02 que codifica VL-CDR3

<400> 145
Gln Ala Trp Asp Thr Asn Thr Val Val
1 5

<210> 146
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo 1A7 que codifica VL-CDR1

<400> 146
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 147
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo 1A7 que codifica VL-CDR2

<400> 147
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo 1A7 que codifica VL-CDR3

<400> 148
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 1 5

<210> 149
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 2F3 que codifica VL-CDR1

<400> 149
 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 150
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 2F3 que codifica VL-CDR2

<400> 150
 Asn Ala Lys Thr Leu Pro Asp
 1 5

<210> 151
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 2F3 que codifica VL-CDR3

<400> 151
 Gln His Phe Trp Ala Ile Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 152
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3P1D10.2C3 que codifica VL-CDR1

<400> 152
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 153
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3P1D10.2C3 que codifica VL-CDR2

<400> 153
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 154
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3P1D10.2C3 que codifica VL-CDR3

<400> 154
 Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Phe Thr
 1 5 10

<210> 155
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3P1E11.3B7 que codifica VL-CDR1

<400> 155
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 156

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo 3P1E11.3B7 que codifica VL-CDR2

<400> 156

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 157

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo 3P1E11.3B7 que codifica para VL-CDR3

<400> 157

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 158

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li02

<400> 158

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Gly Pro Ser Gly Gly Leu Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

	85		90		95
Val Arg Ile Asp Asp Ser Ser Gly Trp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln					
100		105		110	
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val					
	115		120		125
Phe Pro Leu Ala Pro					
130					

<210> 159
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li09
 <400> 159

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
1		5		10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr					
20		25		30	
Ser Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
35		40		45	
Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Lys Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val					
50		55		60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Phe Tyr					
65		70		75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
85		90		95	
Ala Arg Asp Ser Arg Arg Arg Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr His					
100		105		110	
Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val					
115		120		125	
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala					
130		135		140	

Pro
 145
 <210> 160
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li06

<400> 160

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr
20 25 30
Pro Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Val Tyr Ala Asp Ser Ile
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Asp Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro
130

<210> 161

<211> 131

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li05

<400> 161

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Val Ser Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Asp His Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro

130

<210> 162

<211> 131

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li04

<400> 162

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Gly Thr His Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Ser Ile Ala Asp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro

130

<210> 163

<211> 131

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável Li08 sintética

<400> 163

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr

20 25 30

Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Arg Ser Ser Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Glu Ser Pro Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro
130

<210> 164
<211> 134
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de cadeia pesada variável L111 sintética

<400> 164
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Thr Ser Gly Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Thr Ser Asp Asn Asp Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly
100 105 110
Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro
130

<210> 165
<211> 133
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li10

<400> 165

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Pro Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Trp Ile Gly Pro Ser Gly Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Pro Tyr Ser Ser Gly Trp Trp Asp Phe Asp Leu Trp Gly Arg
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro
130

<210> 166

<211> 131

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li01

<400> 166

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

Ala Ser Gly Thr Thr Glu Ala Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro
130

<210> 167
<211> 129
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética Li07

<400> 167

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30
Phe Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Arg His Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro

<210> 168
<211> 132
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li03

<400> 168
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Tyr
 20 25 30
 Pro Met Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Gly Gln Trp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro
 130

<210> 169
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Lil2

<400> 169
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Tyr
 20 25 30
 Asn Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Ser Ser Ser Gly Gly Met Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Leu Arg Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser
 100 105 110
 Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 130 135 140

Pro

145

<210> 170

<211> 116

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de 1A7

<400> 170

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Phe Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Val His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 171

<211> 115

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de 2F3

<400> 171

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

65		70		75		80									
Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Ile	Tyr
85		90		95											
Phe	Cys	Thr	Pro	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr
100		105		110											
Val	Ser	Ser													
115															

<210> 172
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de 3P1D10.2C3 3P1E11.3B7

<400>	172														
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala
1		5		10		15									
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser
		20		25		30									
Trp	Thr	Gln	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
35		40		45											
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Phe
50		55		60											
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65		70		75		80									
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
		85		90		95									
Ala	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser
		100		105		110									
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
115															

<210> 173
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li02

<400>	173					
gaaggttcaat	tgttagagtc	tggtggcggc	ctgtttcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	acttacgaga	tgatttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttgagtg	ggtttcttct	atcggtcctt	ctggtggcct	tacttggtat	180

gctgactccg	ttaaaggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaagggtgaggac	accgccatgt	attactgtgt	acggattgat		300
gatagtagtg	gttgggcttttgatatctgg	ggccaagggga	ccacggtcac	cgtctcaagc		360
gcctccacca	agggcccatcggctcttccc	ctagcacc				399

<210> 174

<211> 435

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li09

<400> 174

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcggt	cttggtcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	atgtactcta	tggtttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttcttat	atctctcctt	ctggtggcaa	gactatgtat	180
gctgactccg	ttaaaggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactttctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagattcg	300
agacgccggt	attacgattt	ttggagtggg	tatcacaact	actactacta	ctacatggac	360
gtctggggca	aagggaccac	ggtcaccgtc	tcaagcgcct	ccaccaaggg	cccatcggtc	420
ttcccgtag	cacc					435

<210> 175

<211> 393

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li06

<400> 175

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcggt	cttggtcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	gagtacccta	tggtttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttcttct	atctattctt	ctggtgggtc	tactgtttat	180
gctgactcca	ttaaaggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	cagagagggg	300
gactctgatg	cttttgatat	ctggggccaa	gggacaatgg	tcaccgtctc	aagcgctcc	360
accaagggcc	catcggtctt	cccgtagca	ccc			393

<210> 176

<211> 393

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li05

<400> 176

gaagttcaat	tgtttagagtc	tggtggcgg	cttggttcagc	ctggtgggttc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	gcttacgcta	tgggttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttcttct	atcgtttctt	ctggtggcta	tactgattat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	cagagaggggt	300
gaccataatg	cttttgatat	ctggggccaa	gggacaatgg	tcaccgtctc	aagcgctctc	360
accaagggcc	catcggtctt	cccgttagca	ccc			393

<210> 177

<211> 393

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li04

<400> 177

gaagttcaat	tgtttagagtc	tggtggcgg	cttggttcagc	ctggtgggttc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	cgttacaata	tgggttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttctgtt	atctatcctt	ctggtggcgg	tactcattat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagttctata	300
gcagatgatg	cttttgatat	ctggggccaa	gggacaatgg	tcaccgtctc	aagcgctctc	360
accaagggcc	catcggtctt	cccgttagca	ccc			393

<210> 178

<211> 393

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li08

<400> 178

gaagttcaat	tgtttagagtc	tggtggcgg	cttggttcagc	ctggtgggttc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	cattacgaga	tgggttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttcttct	atccgttctt	ctggtggcgc	tactaagtat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gaaagagtcg	300
ccagacgact	actttgacta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	aagcgctctc	360

accaagggcc catcggtctt cccgctagca ccc 393

<210> 179

<211> 402

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de L1l1

<400> 179

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcgg	ctgttcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	tcttacgcta	tgtattgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttcttct	atctctactt	ctggtggcta	tactggttat	180
gctgactccg	ttaaaggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagatacc	300
agcgataatg	actactacta	catggacgtc	tggggcaaag	ggaccacgg	caccgtctca	360
agcgctcca	ccaagggccc	atcggtcttc	ccgctagcac	cc		402

<210> 180

<211> 399

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de L1l0

<400> 180

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcgg	cttattcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	acttacccta	tggtttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttcttgg	atcggtcctt	ctggtggcgt	tactgcttat	180
gctgactccg	ttaaaggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagaccctat	300
agcagtggct	ggtgggactt	cgatctctgg	ggcgtggca	ccctggtcac	cgtctcaagc	360
gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccg	ctagcaccc			399

<210> 181

<211> 393

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li01

<400> 181

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcgg	ctgttcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	aagtaccaga	tgacttgggt	tcgccaagct	120

cctggttaaag	gtttggagtg	ggtttcttct	atctatcctt	ctggtggcaa	tactgtttat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagtgggact	300
acagaggcag	tctttgacta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	aagcgcctcc	360
accaagggcc	catcggctctt	cccgcctagca	ccc			393

<210> 182

<211> 387

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li07

<400> 182

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcggt	ctgttcagc	ctggtggttc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	atgtacttta	tgggttgggt	tcgccaagct	120
cctggttaaag	gtttggagtg	ggtttcttct	atctctcctt	ctggtggctt	tacttcttat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	actgcaqtct	actattgtgc	gagagatcgg	300
catgcttttg	atatctgggg	ccaagggaca	atggtcaccg	tctcaagcgc	ctccaccaag	360
ggcccatcgg	tcttcccgtc	agcaccc				387

<210> 183

<211> 396

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li03

<400> 183

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcggt	ctgttcagc	ctggtggttc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	cagtacccta	tggagtgggt	tcgccaagct	120
cctggttaaag	gtttggagtg	ggtttcttct	atctatcctt	ctggtggctc	tactgtttat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagcgggg	300
cagtggctgg	gggactttga	ctactggggc	cagggaaccc	tggtcaccgt	ctcaagcgcc	360
tccaccaagg	gcccacgcgt	cttcccgcga	gcaccc			396

<210> 184

<211> 435

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li12

<400> 184

gaagttcaat	tgttagagtc	tggtagcggt	cttggtcagc	ctgggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	cagtacaata	tgttttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttctcgt	atctcttctt	ctgggtggcat	gactatgtat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagaagcg	300
ttacggcctt	attgtagtgg	tggtagctgc	tactccgact	actactacta	cggtagggac	360
gtctggggcc	aaggggaccac	ggtcaccgtc	tcaagcgctt	ccaccaaggg	cccacgggtc	420
ttcccgttag	caccc					435

<210> 185

<211> 357

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li02

<400> 185

ttctattctc	acagtgcaca	gtacgaattg	actcagccac	cctcagtgtc	cgtgtcccca	60
ggacagacag	ccagcatcac	ctgctctgga	gataaattgg	gggataaatt	tgcttcctgg	120
tatcagcaga	aggcaggcca	gtcccctgtg	ctggctcatct	ttcaagatag	gaagcgtctc	180
tcagggatcc	ctgagcgatt	ctctggctcc	aactctggga	acacagccac	tctgaccatc	240
agcgggaccc	aggctatgga	tgaggctgac	tattactgtc	aggcgtggga	caccaacact	300
gtggtcttcg	gcggaggggac	caagctgacc	gtcctaggtc	agcccaaggc	tgcccc	357

<210> 186

<211> 360

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li09

<400> 186

ttctattctc	acagtgcaca	agacatccag	atgaccagct	ctccatcctc	cctgtctgca	60
tttgtgggag	acagagtcgc	catcacttgc	cgcgcaagtc	agagcatcga	cacattattta	120
aattgggtatc	agcagaaacc	agggaagcc	cctaaactcc	tgatctatgc	tgcatccaag	180
ttggaagacg	gggtcccatc	aagattcagt	ggcagtggaa	ctgggacaga	tttactctc	240
accatcagaa	gtctgcaacc	tgaagatctt	ggaacttact	actgtcaaca	gagttacagt	300
ccccctctca	ctttcgcgcg	agggaccaag	gtggagatca	aacgaactgt	ggctgcacca	360

<210> 187

<211> 360

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li06

<400> 187

ttctattctc	acagtgcaca	agacatccag	atgacccagt	ctccttccac	cctgtctgca	60
tctgtaggag	acagagtcac	catcacttgc	cgggccagtc	agagtattag	tagctggttg	120
gcctggatc	agcagaaacc	agggaaagcc	cctaacctcc	tgatctatgc	tgcatccagt	180
ttacgaactg	gggtcccatc	aagattcagg	ggcagtggat	ctggcacaga	tttactctc	240
accatcagca	gcctgcagcc	tgaagatttt	gcaacgtatt	actgtctaca	agattacagt	300
taccctctca	cttttggcca	ggggaccaag	ctggagatca	aacgaactgt	ggctgcacca	360

<210> 188

<211> 363

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li05

<400> 188

ttctattctc	acagtgcaca	gagcgtcttg	actcagccac	cctcgggtgc	agtggcccca	60
ggccagacgg	ccaggatttc	ctgtggggga	gacaacattg	gaagtaagag	tgtccactgg	120
taccagcaga	ggccaggcca	ggcccctgtc	ctggtcgtgt	atgatgatta	tgaccggccc	180
tcagggatcc	ctgagcgatt	ctctggctcc	aactctgggg	acacggccat	cctgaccatc	240
accagggtcg	aagtcgggga	tgaggccgac	ttttattgtc	aggtgaggga	cagccgtact	300
gaggaacggg	tgttcggcgg	agggaccaag	gtgaccgtct	taggtcagcc	caaggctgcc	360
ccc						363

<210> 189

<211> 360

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li08

<400> 189

ttctattctc	acagtgcaca	agacatccag	atgacccagt	ctccatcttc	cctgtctgca	60
tctgtaggag	acagagtcac	catcacttgc	caggcgagtc	aggacattag	ttactattta	120
aattggatc	agcagaagcc	agggaaagcc	cctaagggtcc	tgatctacga	tgtatccaat	180
ttgcaaacag	gggtcccatc	aaggttcagt	ggaagtgcgt	ctgcgacaga	ttttactctc	240
accatcagca	gcctgcagcc	tgaagatatt	gcgacatatt	actgtcaaca	gtctgataat	300
ctccctctca	ctttcggcgg	agggaccaag	gtggagatta	aacgaactgt	ggctgcacca	360

<210> 190

<211> 360

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de L11

<400> 190

ttctattctc	acagtgcaca	agacatccag	atgacccagt	ctccatcttc	tgtgtctgca	60
cctataggag	acagagtcac	catcacttgt	cgggcgagtc	aggagattgc	caactactta	120
gcctgggtatc	agcagaaacc	agggaaagcc	cctaagctcc	tgatctatga	tacatacact	180
ttgcagactg	acgtcccacc	gaggttcagc	ggcagtggtt	cggggacaga	tttactctc	240
actatcagca	gcctgcagcc	tgaagatact	gcaacttact	tttgtcaaca	ggctgacatt	300
ttcccgtctc	ctttcgcgcg	agggaccaag	gtggagatca	aacgaactgt	ggctgcacca	360

<210> 191

<211> 366

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de L110

<400> 191

ttctattctc	acagtgcaca	agacatccag	atgacccagt	ctccatcttc	catgtctgct	60
tctgtagggg	acacagtcac	catcacttgt	cgggcgagtc	agggtattgg	caactgggta	120
gcctgggtatc	agcagaaacc	agggaaagcc	ccaactctcc	tgatctatgc	tgcatccagt	180
ttggaaagtg	gggtcccatc	aaggttcacc	ggcagcggca	gttcctctgg	gatagatttc	240
actctcacca	tcagcgacct	gcaccctgaa	gatttggcaa	cttactattg	tcaacaggct	300
cagactttcc	cgctcacctt	cggcggaggg	accaggggtg	acctcaagcg	aactgtggct	360
gcacca						366

<210> 192

<211> 363

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li01

<400> 192

ttctattctc	acagtgcaca	agacatccag	atgacccagt	ctccatcctc	cctgtctgca	60
tctgtaggag	acagagtcac	catcacttgc	caggcgagtc	aggacattag	caactattta	120
aattgggtatc	agcagaaacc	agggaaagcc	cctaagctcc	tgatctacga	tgcatccaat	180
ttggaaacag	gggtcccatc	aaggttcagc	ggcagtggtt	ctgggacaga	tttactctc	240
accatcagca	gcctgcagcc	tgaagatttt	gcaacttact	attgtcaaca	ggctgacagg	300
ttccctgcgg	tcactttcgg	cggagggacc	aaggtggaga	tcaaacgaac	tgtggctgca	360
cca						363

<210> 193
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li07

<400> 193

ttctattctc	acagtgcaca	gagcgaattg	actcagccac	cctcagtgtc	cgtgtcccca	60
ggacagacag	ccatcatcac	ctgctctgga	gatcagttgg	gtgacaaaca	tgtggcttgg	120
tatcaacaga	agccaggcca	gtcccctgtg	ctggatcatct	atctagacat	taagaggccc	180
gcagggattt	ctgagcgatt	ctctggctcc	aactctggaa	atacagccac	tctgaccatc	240
agagggaccc	aggctatgga	tgaagctgac	tattactgtc	aggcgtggga	catcaagacg	300
gtcttcg'gcg	gggggaccaa	gctgaccgtc	ctgagtcagc	ccaaggctgc	ccc354	

<210> 194
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li03

<400> 194

ttctattctc	acagtgcaca	agacatccag	atgaccacagt	ctccatcctc	cctgtctgca	60
tctgtaggag	acagagtcac	catcacttgc	cgggcaagtc	aqagcattaq	cagctattta	120
aattggtatc	agcagaaacc	agggaaagcc	cctaagctcc	tgatctatgc	tgcatccagt	180
ttgcaaagtg	gggtcccatc	aaggttcagt	ggcagtggtg	ctgggacaga	tttactctc	240
accatcagca	gtctgcaacc	tgaagatctt	gcaacttact	actgtcaaca	gagttacagt	300
accccggtgga	cgttcggcca	agggaccaag	gtggaaatca	aacgaactgt	ggctgcacca	360

<210> 195
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.01 que codifica para VH-CDR1

<400> 195

Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asn	Tyr	Trp	Ile	Gly
1				5				10	

<210> 196

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.01 que codifica para VH-CDR2

 <400> 196
 Ile Ile Asp Pro Asp Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 197
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.01 que codifica para VH-CDR3
 <400> 197

 Ala Glu Phe Tyr Trp Gly Ala Tyr Asp Gly
 1 5 10

 <210> 198
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.02 que codifica para VH-CDR1

 <400> 198
 Gly Gly Ser Ile Arg Gly Asn Tyr Trp Ser
 1 5 10

 <210> 199
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.02 que codifica para VH-CDR2

<400> 199
 Ser Ile Asn Tyr Ser Gly Phe Thr Asn Pro Ser Leu Lys Gly
 1 5 10

<210> 200
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.02 que codifica para VH-CDR3

<400> 200
 Val Arg His Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 201
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.03 que codifica para VH-CDR1

<400> 201
 Gly Tyr Thr Phe Asn Gly Phe Asp Met His
 1 5 10

<210> 202
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.03 que codifica para VH-CDR2

<400> 202
 Trp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly
 <210> 203
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.03 que codifica para VH-CDR3

<400> 203
 Asp Phe Tyr Met Asp Gly His Tyr Tyr Ile Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 204
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.04 que codifica para VH-CDR1

<400> 204
 Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 205
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.04 que codifica para VH-CDR2

<400> 205
 Ile Ile Asp Pro Gly Asp Ser Phe Thr Ser Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

<210> 206
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.04 que codifica para VH-CDR3

<400>
 206
 Asp Leu Ala Trp Ile Asp Tyr Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 207
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.05 que codifica para VH-CDR1

 <400> 207
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser His Thr Val Ser
 1 5 10

 <210> 208
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.05 que codifica para VH-CDR2

 <400> 208
 Ser Ile Thr Gly Asn Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 209
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.05 que codifica para VH-CDR3

 <400> 209
 Phe Tyr Gly Asp Phe Asp Ser
 1 5

 <210> 210
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.06 que codifica para VH-CDR1

 <400> 210
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn Trp Met Ser
 1 5 10

<210> 211
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.06 que codifica para VH-CDR2

 <400> 211
 Thr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 212
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.06 que codifica para VH-CDR3

 <400> 212

 Asp Leu Pro Met Lys Gly Phe Ile Gln Gln Arg Tyr Gly Phe Asp Asp
 1 5 10 15

 Val

 <210> 213
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.07 que codifica VH-CDR1

 <400> 213
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile Ser
 1 5 10

 <210> 214
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.07 que codifica para VH-CDR2

<400> 214
 Thr Ile Trp Gly Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 215
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.07 que codifica para VH-CDR3

<400> 215
 Glu Tyr Trp Tyr Tyr Asp Gln Phe Thr Ala Val
 1 5 10

<210> 216
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.08 que codifica para VH-CDR1

<400> 216
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Ser
 1 5 10

<210> 217
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.08 que codifica para VH-CDR2

<400> 217
 Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val
 1 5 10 15

Lys Ser

<210> 218
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.08 que codifica para VH-CDR3

 <400> 218
 Glu Val Tyr Ser Ala Gly Ile Met Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 219
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.09 que codifica para VH-CDR1

 <400> 219
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asn His Trp Ile Gly
 1 5 10

 <210> 220
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.09 que codifica para VH-CDR2

 <400> 220
 Ile Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 221
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.09 que codifica para VH-CDR3

<400> 221
 Gly Phe Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 222
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.10 que codifica para VH-CDR1

<400> 222
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Ala
 1 5 10

<210> 223
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.10 que codifica para VH-CDR2

<400> 223
 Met Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asn Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 224
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.10 que codifica para VH-CDR3

<400> 224
 Thr Asn Tyr Leu Gly Phe Tyr Asp Ser
 1 5

<210> 225
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.11 que codifica para VH-CDR1

 <400> 225
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10

 <210> 226
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.11 que codifica para VH-CDR2

 <400> 226
 Asn Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 227
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.11 que codifica para VH-CDR3

 <400> 227
 Gly Tyr Pro Thr Asp Asp Tyr Ser Phe Asp Ile
 1 5 10

 <210> 228
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.12 que codifica para VH-CDR1

 <400> 228
 Gly Asp Ser Val Ser Asp Asn Ser Ala Ala Trp Gly
 1 5 10

<210> 229
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.12 que codifica para VH-CDR2

 <400> 229
 Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val
 1 5 10 15

 Lys Ser

 <210> 230
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.12 que codifica para VH-CDR3

 <400> 230
 Gly Arg His Glu Tyr Gly Gly Leu Gly Tyr Ala Glu Ala Met Asp His
 1 5 10 15

 <210> 231
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.13 que codifica para VH-CDR1

 <400> 231
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5 10

 <210> 232
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.13 que codifica para VH-CDR2

<400> 232

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 233

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.13 que codifica para VH-CDR3

<400> 233

His Tyr Thr Tyr Met His Phe Glu Asp Tyr

1 5 10

<210> 234

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.01 que codifica para VL-CDR1

<400> 234

Ser Gly Asp Ser Leu Pro Ser Lys Phe Val His

1 5 10

<210> 235

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.01 que codifica para VL-CDR2

<400> 235

Arg Asp Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 236

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.01 que codifica para VL-CDR3

 <400> 236
 Ser Ser Tyr Asp Ala Leu Thr Asp
 1 5

 <210> 237
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.02 que codifica para VL-CDR1

 <400> 237
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Leu Gly
 1 5 10

 <210> 238
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.02 que codifica para VL-CDR2

 <400> 238
 Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

 <210> 239
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.02 que codifica para VL-CDR3

 <400> 239
 Gln Gln Ala Ser Asp Ala Pro Glu
 1 5

 <210> 240

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.03 que codifica para VL-CDR1

 <400> 240
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Phe Trp Leu Asn
 1 5 10

 <210> 241
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.03 que codifica para VL-CDR2

 <400> 241
 Ala Gly Ser Asn Leu Gln Ser
 1 5

 <210> 242
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.03 que codifica para VL-CDR3

 <400> 242
 Met Gln Asp Ser Asp Phe Pro Phe
 1 5

 <210> 243
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.04 que codifica para VL-CDR1

 <400> 243
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val Ser
 1 5 10

<210> 244
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.04 que codifica para VL-CDR2

 <400> 244
 Arg Asn Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 245
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.04 que codifica para VL-CDR3

 <400> 245
 Gln Thr Tyr Asp Asn Ser Thr Asp
 1 5

 <210> 246
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.05 que codifica para VL-CDR1

 <400> 246
 Ser Gly Asp Asn Ile Arg Ser Tyr Tyr Val His
 1 5 10

 <210> 247
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.05 que codifica para VL-CDR2

 <400> 247
 Glu Asp Ser Asn Arg Pro Ser

Gln Gln Tyr Tyr Gly Met Pro Leu

1 5

<210> 252

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.07 que codifica para VL-CDR1

<400> 252

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Gln Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 253

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.07 que codifica para VL-CDR2

<400> 253

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 254

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.07 que codifica para VL-CDR3

<400> 254

Gln Gln Tyr Gly Ser Val Pro Arg

1 5

<210> 255

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.08 que codifica para VL-CDR1

<400> 255

Ser Gly Asp Ser Leu Gly Ser Tyr Tyr Val His

1 5 10

<210> 256

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.08 que codifica para VL-CDR2

<400> 256

Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 257

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.08 que codifica para VL-CDR3

<400> 257

Ser Ala Tyr Asp Tyr Ser Ala Arg Thr

1 5

<210> 258

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lia.09 que codifica para VL-CDR1

<400> 258

Ser Gly Asp Asn Leu Gly Ser Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 259

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.09 que codifica para VL-CDR2

<400> 259
 Asp Asp Asp Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 260
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.09 que codifica para VL-CDR3

<400> 260
 Ser Ser Tyr Asp Phe Leu Asn Ile Gly Leu
 1 5 10

<210> 261
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.10 que codifica para VL-CDR1

<400> 261
 Ser Gly Asp Ser Leu Gly Lys Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 262
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Ha.10 que codifica para VL-CDR2

<400> 262
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 263
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.10 que codifica para VL-CDR3

 <400> 263
 Ser Ser Tyr Thr Asn Ser Val Asp
 1 5

 <210> 264
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.11 que codifica para VL-CDR1

 <400> 264
 Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Gly
 1 5 10

 <210> 265
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.11 que codifica para VL-CDR2

 <400> 265
 Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 266
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.11 que codifica para VL-CDR3

 <400> 266
 Gln Ser Tyr Asp Asp Thr Ser Ile
 1 5

<210> 267
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.12 que codifica para VL-CDR1

 <400> 267
 Ser Gly Asp Ser Leu Gly Asn Lys Tyr Val His
 1 5 10

 <210> 268
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.12 que codifica para VL-CDR2

 <400> 268
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 269
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.12 que codifica para VL-CDR3

 <400> 269
 Gln Thr Trp Asp Tyr Val Gly Tyr
 1 5

 <210> 270
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Lia.13 que codifica para VL-CDR1

 <400> 270
 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

Asp Thr Asn Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 115

<210> 274

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li09

<400> 274

Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ile Asp Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp Gly
 50 55 60
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 65 70 75 80
 Thr Ile Arg Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85 90 95
 Gln Ser Tyr Ser Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
 100 105 110
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 115 120

<210> 275

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li06

<400> 275

Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
 20 25 30
 Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

35		40		45											
Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Arg	Thr	Gly
50				55						60					
Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu
65				70				75							80
Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu
85				90						95					
Gln	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
100				105						110					
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro								
115				120											

<210> 276

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li05

<400> 276

Phe	Tyr	Ser	His	Ser	Ala	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val
1				5					10					15	
Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Ile	Ser	Cys	Gly	Gly	Asp	Asn
20				25					30						
Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala
35				40					45						
Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro
50				55					60						
Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Ile	Leu	Thr	Ile
65				70					75					80	
Thr	Arg	Val	Glu	Val	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Phe	Tyr	Cys	Gln	Val	Arg
85									90				95		
Asp	Ser	Arg	Thr	Glu	Glu	Arg	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr
100				105					110						
Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro							
115				120											

<210> 277

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética

<400> 277

```
Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
1          5          10          15
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala
20          25          30
Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35          40          45
Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Asp Val Ser Asn Leu Gln Thr Gly
50          55          60
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu
65          70          75          80
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
85          90          95
Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
100         105         110
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
115         120
```

<210> 278

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de L111

<400> 278

```
Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
1          5          10          15
Ser Val Ser Ala Pro Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
20          25          30
Ser Gln Glu Ile Ala Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35          40          45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Tyr Thr Leu Gln Thr Asp
50          55          60
Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
65          70          75          80
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
85          90          95
Gln Ala Asp Ile Phe Pro Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
100         105         110
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
115         120
```

<210> 279

<211> 122

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li10

<400> 279

```
Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
1          5          10          15
Ser Met Ser Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
20          25          30
Ser Gln Gly Ile Gly Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35          40          45
Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly
50          55          60
Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ile Asp Phe
65          70          75          80
Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu His Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr
85          90          95
Cys Gln Gln Ala Gln Thr Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg
100         105         110
Val Asp Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
115         120
```

<210> 280

<211> 121

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li01

<400> 280

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


50		55		60												
Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	
65					70					75					80	
Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
				85					90					95		
Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	
			100					105					110			
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro									
115					120											

<210> 283
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia leve variável sintética de 1A7

<400>	283															
Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	
1			5						10					15		
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	
20				25					30							
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	
35				40					45							
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
50				55					60							
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	
65				70					75					80		
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	
85				90					95							
Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys							
100				105												

<210> 284
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia leve variável sintética de 2F3

<400>	284															
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
1			5						10					15		
Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Asn	Ile	Tyr	Asn	Tyr	

<400> 286

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

<210> 287
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (3) .. (5)
<223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<400> 287
Ile Thr Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 288
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (3) .. (5)
<223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagi-

<400> 288
 Ala Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 289
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de péptido sintético Sp35

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (3) . . (5)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<400> 289
 Val Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 290
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento péptido Sp35 sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (3) . . (5)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<400> 290
 Ser Pro Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 291
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 291
 Ser Pro Arg Lys His
 1 5

<210> 292
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 292
 Ser Pro Arg Lys Lys
 1 5

<210> 293
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 293
 Ser Pro Arg Lys Arg
 1 5

<210> 294
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp3S sintético

<400> 294
 Ser Pro Lys Lys His
 1 5

<210> 295
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 295

Ser Pro His Lys His

1 5

<210> 296

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 296

Ser Pro Arg Arg His

1 5

<210> 297

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 297

Ser Pro Arg His His

1 5

<210> 298

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 298

Ser Pro Arg Arg Arg

1 5

<210> 299

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético
 <400> 299
 Ser Pro His His His
 1 5

<210> 300
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético
 <400> 300
 Ser Pro Lys Lys Lys
 1 5

<210> 301
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético
 <400> 301
 Leu Ser Pro Arg Lys His
 1 5

<210> 302
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético
 <400> 302
 Leu Ser Pro Arg Lys Lys
 1 5

<210> 303
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 307
 Leu Ser Pro Arg His His
 1 5

 <210> 308
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 308
 Leu Ser Pro Arg Arg Arg
 1 5

 <210> 309
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 309
 Leu Ser Pro His His His
 1 5

 <210> 310
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 310
 Leu Ser Pro Lys Lys Lys
 1 5

 <210> 311
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 311
 Trp Leu Ser Pro Arg Lys His
 1 5

 <210> 312
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético
 <400> 312
 Trp Leu Ser Pro Arg Lys Lys
 1 5

 <210> 313
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 313
 Trp Leu Ser Pro Arg Lys Arg
 1 5

 <210> 314
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 314
 Trp Leu Ser Pro Lys Lys His
 1 5

 <210> 315

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético
 <400> 315
 Trp Leu Ser Pro His Lys His
 1 5

 <210> 316
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 316
 Trp Leu Ser Pro Arg Arg His
 1 5

 <210> 317
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 317
 Trp Leu Ser Pro Arg His His
 1 5

 <210> 318
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 318
 Trp Leu Ser Pro Arg Arg Arg
 1 5

<210> 319
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 319
 Trp Leu Ser Pro His His His
 1 5

 <210> 320
 <211> 1
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 320
 Trp Leu Ser Pro Lys Lys Lys
 1 5

 <210> 321
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 321
 Ile Thr Pro Lys Arg Arg
 1 5

 <210> 322
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 322
 Ala Cys His His Lys

```

1             5
<210>      323
<211>      5
<212>      PRT
<213>      Sequência artificial

<220>
<223>      Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400>      323
Val Cys His His Lys
1             5

<210>      324
<211>      5
<212>      PRT
<213>      Sequência artificial

<220>
<223>      Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<220>
<221>      CARACTERÍSTICA_MISTA
<222>      (1)..(2)
<223>      Xaa pode ser qualquer aminoácido
<400>      324
Xaa Xaa Arg Lys His
1             5

<210>      325
<211>      5
<212>      PRT
<213>      Sequência artificial

<220>
<223>      Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<220>
<221>      CARACTERÍSTICA_MISTA
<222>      (1) .. (2)
<223>      Xaa pode ser qualquer aminoácido

<400>      325
Xaa Xaa Arg Arg Arg
1             5

```

<210> 326
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1) . . (2)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

 <400> 326
 Xaa Xaa Lys Lys Lys
 1 5

 <210> 327
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1) . . (2)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

 <400> 327
 Xaa Xaa His His His
 1 5

 <210> 328
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideode Sp35 sintético

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1) .. (2)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

<400> 328

Xaa Xaa Arg Lys Lys

1 5

<210> 329

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1) .. (2)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

<400> 329

Xaa Xaa Arg Lys Arg

1 5

<210> 330

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISTA

<222> (1) ..(2)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

<400> 330

Xaa Xaa Lys Lys His

1 5

<210> 331

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1) . . (2)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

 <400> 331
 Xaa Xaa His Lys His
 1 5

 <210> 332
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1) .. (2)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido
 <400> 332
 Xaa Xaa Arg Arg His
 1 5

 <210> 333
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1) .. (2)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido
 <400> 333
 Xaa Xaa Arg His His
 1 5

 <210> 334
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (3) .. (3)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (4) . . (4)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (5) .. (5)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<400> 334
 Ile Thr Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 335
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (3) .. (3)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (4) . . (4)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (5) .. (5)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<400> 335
 Ala Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 336
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptídeo de Sp35 sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (4) .. (4)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<400> 336
 Val Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 337
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (3) .. (3)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (4) . . (4)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (5) .. (5)
 <223> Xaa pode ser lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina

 <400> 337
 Ser Pro Xaa Xaa Xaa
 1 5

 <210> 338
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp3S sintético

 <400> 338
 Ser Pro Arg Leu His
 1 5

 <210> 339
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 339
 Arg Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys
 1 5

 <210> 340
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

 <400> 340

Lys Lys Val Lys Val Lys Glu Lys Arg

1 5

<210> 341

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 341

Arg Arg Leu Arg Leu Arg Asp Arg Lys

1 5

<210> 342

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 342

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Asp Arg Lys

1 5

<210> 343

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de peptideo de Sp35 sintético

<400> 343

Arg Arg Ile Arg Ala Arg Asp Arg Lys

1 5

<210> 344

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador adiante sintético usado para mostrar expressão de Sp35

<400> 344
 agagacatgc gattggtga 19

<210> 345
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador reverso sintético usado para mostrar expressão de Sp35 345

<400> agagatgtag acgaggtcat t 21

<210> 346
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Nucleotideo de RNAi de Sp35 sintético

<400> 346
 tgatcgatcat cctgctagac ttcaagagag tctagcagga tgacgatctt ttttc 55

<210> 347
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Nucleotideo de RNAi de Sp35 sintético

<400> 347
 tcgagaaaaa agatcgatcat cctgctagac tctcttgaag tctagcagga tgacgatca 59

<210> 348
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Nucleotideo de RNAi de Sp35 sintético

<400> 348
 tgatcctcat ccttctatac ttcaagagag tgtagcagga tgacgatctt ttttctcga 59

<210> 349
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Nucleotideo de RNAi de Sp35 sintético

 <400> 349
 tcgagaaaaa agatcgatcat cctgctagac tctcttgaag tatagaagga tgacgatca 59

 <210> 350
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético usado para amplificar Sp35 de comprimento total de camundongo

 <400> 350
 gaggatctcg acgcggccgc atggagacag acacactcct g 41

 <210> 351
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético usado para amplificar Sp35 de comprimento total de camundongo

 <400> 351
 ggggcggaat tggatcctca cagatcctct tctgagatga g 41

 <210> 352
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético usado para amplificar Sp35 negativo dominante

 <400> 352
 gaggatctcg acgcggccgc atggagacag acacactcct g 41

<210> 353
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético usado para amplificar Sp35 negativo dominante

 <400> 353
 gatacggatc ctcagccttt gccccggctc catagaaaca gc 42

 <210> 354
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético usado para obter sequência de codificação parcial para humano Sp35

 <400> 354
 cagcaggtcg acgcggccgc atgctggcgg ggggcgt 37

 <210> 355
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético usado para obter sequência de codificação parcial para humano Sp35

 <400> 355
 cagcaggtcg acctcgcccg gctggttggc caaccagccg ggcgaggtcg acctcgagg 59

 <210> 356
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador sintético usado para determinar uma sequência da cadeia levedo P1E11.3B7

 <400> 356

ggggatatcc accatggatt ttcaggtgca gattttcag 39

<210> 357

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético usado para determinar uma sequência da cadeia
levedo P1E11.3B7

<400> 357

ggggatatcc accatgragt cacakacyca ggtcttyrta 40

<210> 358

<211> 37

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético usado para determinar uma sequência da cadeia leve
do P1E11.3B7

<400> 358

ggggatatcc accatgaagt tgcctgtag gctgttg 37

<210> 359

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético usado para determinar uma sequência da cadeia leve
do P1E11.3B7

<400> 359

ggggatatcc accatgaagt tgcctgtag gctgttg 40

<210> 360

<211> 39

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético usado para determinar uma sequência da cadeia
pesada do P1E11.3B7

<400> 360
Ggggatatcc accatggrat gsagctgkgt matsctctt 39

<210> 361
<211> 39
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético usado para determinar uma sequência da cadeia pesada do P1E11.3B7

<400> 361
Ggggatatcc accatgract tcgggtgag ctkggttt 39

<210> 362
<211> 38
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético usado para determinar uma sequência da cadeia pesada do P1E11.3B7

<400> 362
Ggggatatcc accatggctg tcttggggct gctcttct 38

<210> 363
<211> 39
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador sintético usado para determinar uma sequência da cadeia pesada do P1E11.3B7

<400> 363
Ggggatatcc accatggctg tcttggggct gctcttct 39

<210> 364
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Iniciador universal de cadeia pesada sintética

<400> 364
 22
 aggtsmarct gcagsagtcw gg 22

<210> 365
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador universal de cadeia

<400> 365
 tgaggagacg gtgaccgtgg tcccttggcc ccag 34

<210> 366
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de sequência sinal degenerada sintética

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (21) .. (21)
 <223> n pode ser qualquer nucleotideo

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (24) . . (24)
 <223> n pode ser qualquer nucleotideo

<400> 366
 atggartgya aytggathct nccnttya 28

<210> 367
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador de dominio constante sintético

<400> 367

aggtctagaa yctccacaca caggrccag tggatagac 39

<210> 368

<211> 66

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético usado para amplificar MOG de rato

<400> 368

ggggtatctc tcgagaaaag agagcatcat catcatcatc atatgggaca gttcagagtg 60

ataggg 66

<210> 369

<211> 40

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador sintético usado para amplificar MOG de rato

<400> 369

ttcgcggccg ctattagcca gggttgatcc agtagaaggg 40

<210> 370

<211> 354

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Lil3

<400> 370

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcgg	cttggttcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttcgcgatt	cactttctct	cattacgaga	tgtattgggt	tcgccaagct	120
cctggttaaag	gtttggagtg	ggtttctcgt	atcgtttctt	ctggtggctt	tactaagtat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	aacagagggt	300
gataatgatg	cttttgatat	ctggggccaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	aagc	354

<210> 371

<211> 324

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Lil3


```

<400>      371
gacatccaga  tgacccagtc  tccagccacc  ctgtctttgt  ctccagggga  aagagccacc  60
ctctcctgca  gggccagtc  agtggttagc  agctacttag  cctggtacca  acagaaacct  120
ggccaggctc  ccaggctcct  catctatgat  gcatccaaca  gggccactgg  catcccagcc  180
aggttcagtg  gcagtggggtc  tgggacagac  ttcactctca  ccatcagcag  cctagagcct  240
gaagattttg  cagtttatta  ctgtcagcag  cgtagcaact  ggccgatgta  cacttttggc  300
caggggacca  agctggagat  caaa

```

<210> 372

<211> 118

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Lil3

<400> 372

```

Glu Val  Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20          25          30
Glu Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ser Arg Ile Val Ser Ser Gly Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Thr Glu Gly Asp Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100         105         110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 373

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Lil3

<400> 373

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

```

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

<210> 374
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li32

<400>	374						
gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcgt	ctgttcagc	ctggtggttc	tttacgtctt	60	
tcttgcgctg	cttcgcgatt	cactttctct	gcttacatga	tcagtggtg	tcgccaagct	120	
cctggttaaag	gtttggagtg	ggtttcttct	atctctcctt	ctggtggcaa	tactaagtat	180	
gctgactccg	ttaaaggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240	
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggcctgt	attactgtgc	gagaggagat	300	
tatggatact	ggttcgaccc	ctggggccag	ggcaccctgg	tcaccgtctc	aagc	354	

<210> 375
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li32

<400>	375					
gacatccaga	tgaccagtc	tccagactcc	ctgtctgcat	ctgttgagaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	aqqcqaqtca	agacattaqc	tactatttaa	attggtatca	qcaqaaacca	120
gggatggccc	ctaaactcct	catctacgat	gccttcattt	tggaaggagg	ggcccatca	180
cggttcagtg	ggagcggctc	tgggacagat	ttttctttca	ccatcagcaa	tctacagcct	240
gaggatattg	caacttattt	ctgtcaacag	tctgatcaac	tgcccgtagc	cttcggccaa	300
gggaccaagg	tggaatcaga					321

<210> 376
 <211> 118

<212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li32

<400> 376
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Met Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 377
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li32

<400> 377
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Met Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Phe Ile Leu Glu Gly Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Gln Leu Pro Val
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg

100 105

<210> 378

<211> 357

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li33

<400> 378

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcgg	ctgttcagc	ctggtggttc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttcgggatt	cactttctct	atttacccta	tgttttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttcttgg	atcggtcctt	ctggtggcat	tactaagtat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acagccacat	attactgtgc	gagagagggg	300
cataacgact	ggctacttcga	tctctggggc	cgtggcaccc	tggtcaccgt	ctcaagc	357

<210> 379

<211> 321

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li33

<400> 379

gacatccaga	tgaccagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctctgca	gggccagtc	gagtgttagc	agctacttag	cctggtagca	acagaaacct	120
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcatccaaca	gggccactgg	catcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagag	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagtct	240
gaggattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	tatgataagt	ggccgctcac	tttcggcgga	300
gggaccaagg	tggagatcaa	a				321

<210> 380

<211> 119

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li33

<400> 380

Glu Val	Gln Leu	Leu Glu	Ser Gly	Gly Gly	Leu Val	Gln Pro	Gly Gly
1	5	10	15				
Ser Leu	Arg Leu	Ser Cys	Ala Ala	Ser Gly	Phe Thr	Phe Ser	Ile Tyr
20	25	30					

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

<210> 381
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li33

<400> 381

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

<210> 382
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li34

<400> 382

gaagttcaat	tgtttagagtc	tggtggcggt	cttggttcagc	ctggtgggttc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	aattacgaga	tgtattgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	gqtttctggt	atctattctt	ctggtggcat	tactgtttat	180
gctgactccg	ttaaagggtcg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	tagggcagcc	300
atcctcgact	ggtacttcga	tctctggggc	cgtggcaccc	tggtcaccgt	ctcaagc	357

<210> 383
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li34
 <400> 383

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	atgcgagtca	ggacattagc	aactatttaa	gttggtatca	gcagaaacca	120
ggtaaagccc	ctaaactcct	gatctacgat	gctttcaatt	tgagacaggg	agtcccatcg	180
aggttcagtg	gaagtggatc	tggcacagat	tttacattca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagattttg	caacatatta	ctgtcagcac	tatgataatc	tcccattcac	tttcggccct	300
gggaccagag	tggcgatcag	a				321

<210> 384
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li34

<400> 384

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

115

<210> 385

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética

<400> 385

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

<210> 386

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lil3 que codifica VL-CDR1

<400> 386

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 387

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lil3 que codifica VL-CDR2

<400> 387

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 388

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lil3 que codifica VL-CDR3

<400> 388

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met Tyr Thr

1 5 10

<210> 389

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lil3 que codifica VH-CDR1

<400> 389

His Tyr Glu Met Tyr

1 5

<210> 390

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Lil3 que codifica VH-CDR2

<400> 390

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

1 5 10 15

Gly

<210> 391

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li13 que codifica VH-CDR3

<400> 391
 Glu Gly Asp Asn Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 392
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li32 que codifica VL-CDR1

<400> 392
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 393
 <211>
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li32 que codifica VL-CDR2

<400> 393
 Asp Ala Phe Ile Leu Glu Gly
 1 5

<210> 394
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li32 que codifica VL-CDR3

<400> 394
 Gln Gln Ser Asp Gln Leu Pro Val Thr
 1 5

<210> 395
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li32 que codifica VH-CDR1

 <400> 395
 Ala Tyr Met Met Gln
 1 5

 <210> 396
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li32 que codifica VH-CDR2

 <400> 396
 Ser Ile Ser Pro Ser Glv Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 397
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li32 que codifica VH-CDR3

 <400> 397
 Gly Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Asp Pro
 1 5

 <210> 398
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li33 que codifica VL-CDR1

 <400> 398
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1	5	10

<210> 399
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li33 que codifica VL-CDR2

<400> 399
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 400
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li33 que codifica VL-CDR3

<400> 400
 Gln Gln Tyr Asp Lys Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 401
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li33 que codifica VH-CDR1

<400> 401
 Ile Tyr Pro Met Phe
 1 5

<210> 402
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li33 que codifica VH-CDR2

<400> 402

Trp Ile Gly Pro Ser Gly Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 403

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li33 que codifica VH-CDR3

<400> 403

Glu Gly His Asn Asp Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 404

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li34 que codifica VL-CDR1

<400> 404

His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 405

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li34 que codifica VL-CDR2

<400> 405

Asp Ala Phe Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 406

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li34 que codifica VL-CDR3

<400> 406
Gln His Tyr Asp Asn Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 407
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li34 que codifica VH-CDR1

<400> 407
Asn Tyr Glu Met Tyr
1 5

<210> 408
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li34 que codifica VH-CDR2

<400> 408
Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 409
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li34 que codifica VH-CDR1

<400> 409
Ala Ala Ile Leu Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 410
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VH-CDR1

 <400> 410

 Ser Tyr Trp Met His
 1 5

 <210> 411
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VH-CDR2

 <400> 411
 Val Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 412
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VH-CDR3

 <400> 412
 Pro Tyr Tyr Gly Ser His Trp Phe Phe Asp Val
 1 5 10

 <210> 413
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>

<223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VL-CDR1
 <400> 413
 Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Val His
 1 5 10

<210> 414
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VL-CDR2

<400> 414
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 415
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VL-CDR3

<400> 415
 Gln Gln Trp Ser Thr Asn Pro Pro Thr
 1 5

<210> 416
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de 3B5.2

<400> 416
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Ser His Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Thr
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 417
<211> 106
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de 3B5.2

<400> 417
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Val
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Leu Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Asn
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Thr Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 418
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de cadeia leve capa humana e murina de consenso sintética

<400> 418
Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 419

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável mutante sintética de 3B5.2

<400> 419

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

<210> 420

<211> 1404

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de 3B5.2 de anticorpo quimérico murino e humano sintético

<400> 420

atgggatgga	gctgtgtaat	gctcttggtg	tcaacagcta	caggtgtcca	ctcccaggtc	60
caactgcagc	agcctggggc	tgagctggtg	aggcctggga	cttcagtga	gttgtcctgc	120
agggcttctg	gctacacctt	caccagctac	tggatgcact	gggtaaagca	gaggcctgga	180
caaggccttg	agtggatcgg	agtgattgat	ccttctgata	gttataactaa	ctacaatcaa	240
aagttcaggg	gcaaggccac	attgactgta	gacacatcct	ccagcacagc	ctacatgcag	300
ctcagcagcc	tgacatctga	ggactctgcg	gtctattact	gtgcaagacc	ttactacggt	360
agtcactggt	tcttcgatgt	ctggggcaca	gggaccacgg	tcaccgtctc	ctcagcctcc	420
accaagggcc	catcggctct	ccccctggca	ccctcctcca	agagcacctc	tgggggcaca	480
gcggccctgg	gctgcctggt	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggt	gtcgtggaac	540
tcaggcgccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttcccggctg	tcctacagtc	ctcaggactc	600
tactccctca	gcagcgtggt	gaccgtgccc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	660
tgcaacgtga	atcacaagcc	cagcaacacc	aaggtggaca	agaaagttga	gccccaaatct	720
tgtgacaaga	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	780
gtcttcctct	tcccccaaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgac	ccctgaggtc	840
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	900

gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	960
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	1020
aagtgcgaagg	tctccaacaa	agccctccca	gcccccatcg	agaaaacat	ctccaaagcc	1080
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	1140
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	1200
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagAAC	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgttggaC	1260
tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	1320
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	1380
agcctctccc	tgtctcccgg	ttga				1404

<210> 421

<211> 708

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de 3B5.2 de anticorpo quimérico murino e humano sintético

<400> 421

atggattttc	aggtgcagat	tttcagcttc	ctgctaataca	gtgcctcagt	cataatatcc	60
agaggacaaa	ttgttctcac	ccagtctcca	gcaatcatgt	ctgcatctcc	aggggagaag	120
gtcaccatga	cctgcagtgc	cagctcacgt	gtaagttagc	tgacttggtta	ccagcagaag	180
tcaggcacct	cccccaaaag	atggctttat	gacacatcca	acctggcttc	tggagtcctt	240
gctcgcttcg	gtggcaatgg	gtctgggacc	tcttactctc	tcacaatcag	cagcatggag	300
gctgaagatg	ctgccactta	ttactgccag	cagtggagta	ctaaccacc	cacgttcgga	360
ggggggacca	agctggaaat	aaaacgtacg	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	420
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaact	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	480
tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaag	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	540
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcaccctg	600
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	cacccatcag	660
ggcctgagct	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgttag		708

<210> 422

<211> 360

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de 3B5.2

<400> 422

caggtccaac	tgacagcagc	tggggctgag	ctggtgaggc	ctgggacttc	agtgaagttg	60
tcctgcaggg	cttctggcta	caccttcacc	agctactgga	tgactgggtt	aaagcagagg	120
cctggacaag	gccttgagtg	gatcggagtg	attgatacct	ctgatagtta	tactaaactac	180
aatcaaaagt	tcaggggcaa	ggccacattg	actgtagaca	catcctccag	cacagcctac	240
atgcagctca	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtgc	aagaccttac	300

tacggtagtc actggttctt cgatgtctgg ggcacagggg ccacgggtcac cgtctcctca 360

<210> 423

<211> 318

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de 3B5.2

<400> 423

caaattgttc	tcacccagtc	tccagcaatc	atgtctgcatctccagggga	gaaggtcacc	60
atgacctgca	gtgccagctc	acgtgtaagt	tacgtgcaactggtaccagca	gaagtcaggc	120
acctcccca	aaagatggct	ttatgacaca	tccaacctggcttctggagt	ccctgctcgc	180
ttcggtgcca	atgggtctgg	gacctcttac	tctctcacaatcagcagcat	ggaggctgaa	240
gatgctgcca	cttattactg	ccagcagtgg	agtactaaccacccacggt	cggagggggg	300
accaagctgg	aaataaaa				318

<210> 424

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VH-CDR1

<400> 424

agctactgga	tgac	15

<210> 425

<211> 51

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VH-CDR2

<400> 425

gtgattgatac	cttctgatag	ttataactaac	tacaatcaaaagttcagggg	c	51

<210> 426

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo 3B5. 2 que codifica VH-CDR3

<400> 426
 ccttactacg gtagtcactg gttcttcgat gtc 33

<210> 427
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VL-CDR1

<400> 427
 agtgccagct cacgtgtaag ttacgtgcac 30

<210> 428
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 que codifica VL-CDR2

<400> 428
 gacacatcca acctggcttc t 21

<210> 429
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo 3B5.2 quecodifica VL-CDR3

<400> 429
 cagcagtgga gtactaaccc acccagc 27

<210> 430
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de cadeia leve sintética 1

<400> 430

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

<210> 431

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de cadeia leve sintética 2

<400> 431

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

<210> 432

<211> 116

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Variante de cadeia pesada sintética 2

<400> 432

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20          25          30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35          40          45
Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe
50          55          60
Gln Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Met Ala Met Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Glu Gly Val His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100          105          110
Thr Val Ser Ser
115
```

<210> 433

<211> 447

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li81

<400> 433

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20          25          30
Glu Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ser Val Ile Gly Pro Ser Gly Gly Phe Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Thr Glu Gly Asp Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115          120          125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130          135          140
```

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu 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
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 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 Arg Asp Glu Leu 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
 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 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 434

<211> 215

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li81

<400> 434

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met
85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 435

<211> 447

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesda variável aglicosilada sintética de Li81

<400> 435

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30
Glu Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Gly Pro	Ser Gly Gly Phe Thr	Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Arg Asp Asn	Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Thr Glu Gly Asp	Asn Asp Ala Phe Asp	Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100	105	110
Thr Val Thr Val Ser	Ser Ala Ser Thr Lys	Gly Pro Ser Val Phe Pro
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser	Lys Ser Thr Ser Gly	Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp	Tyr Phe Pro Glu Pro	Val Thr Val Ser Trp Asn
145	150	155 160
Ser Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val Leu Gln
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val	Val Thr Val Pro Ser Ser
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln	Thr Tyr Ile Cys Asn	Val Asn His Lys Pro Ser
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp	Lys Lys Val Glu Pro	Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro Glu	Leu 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
Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val Asp	Val Ser His Glu Asp Pro
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp Gly	Val Glu Val His Asn Ala
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr Asn	Ser Ala 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 Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Glu Lys Thr
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 Arg Asp	Glu Leu 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
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 Lys	Leu Thr Val Asp Lys Ser
405	410	415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 436
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VH-CDR1

<400> 436
 Ala Tyr Glu Met Lys
 1 5

<210> 437
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VH-CDR2

<400> 437
 Val Ile Gly Pro Ser Gly Gly Phe Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 438
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VH-CDR3

<400> 438
 Glu Gly Asp Asn Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 439
 <211> 15
 <212> ADN

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VH-CDR1

 <400> 439
 gcttacgaga tgaag 15

 <210> 440
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VH-CDR2

 <400> 440
 gttatcggtc cttctggtgg ctttactttt tatgctgact ccgttaaagg t 51

 <210> 441
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VH-CDR3

 <400> 441
 gagggtgata atgatgcttt tgatatac 27

 <210> 442
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VL-CDR1

 <400> 442
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

 <210> 443
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VL-CDR2

<400> 443
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 444
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VL-CDR3

<400> 444
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 445
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VL-CDR1

<400> 445
agggccagtc agagtgttag cagctactta gcc 33

<210> 446
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VL-CDR2

<400> 446
gatgcatcca acagggccac t 21

<210> 447
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência sintética de anticorpo Li81 que codifica VL-CDR3

<400> 447

cagcagcgta gcaactggcc gatgtacact

30

<210> 448

<211> 1341

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável sintética de Li81

<400> 448

gaagtacaat	tgtagagtc	tggtggcgg	cttgttçagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	gcttacgaga	tgaagtgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttctgtt	atcggtcctt	ctggtggctt	tactttttat	180
gctgactccg	ttaaaggctg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	aacagaggggt	300
gataatgatg	cttttgatat	ctggggccaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	aagcgcctcc	360
accaagggcc	catcggctct	ccccctggca	ccctcctcca	agagcacctc	tgggggcaca	420
gcggccctgg	gctgcctgg	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacgg	gtcgtggaac	480
tcaggcgccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttcccggtg	tcctacagtc	ctcaggactc	540
tactccctca	gcagcgtgg	gaccgtgccc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	600
tgcaacgtga	atcacaagcc	cagcaacacc	aagggtggaca	agaaagttga	gccccaatct	660
tgtgacaaga	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	720
gtcttcctct	tcccccaaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgac	ccctgaggtc	780
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	840
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	900
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	960
aagtgcaagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaacat	ctccaaagcc	1020
aaaqggcaqc	cccgaqaacc	acaggtgtac	accctqcccc	catcccgqqa	tgagctgacc	1080
aagaaccagg	tcagcctgacctgctgg	aaaggttct	atcccagcga	catcgccgtg		1140
gagtgggaga	gcaatgggcagccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgttgac		1200
tccgacggct	ccttcttctctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag		1260
gggaacgtct	tctcatgctccgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag		1320
agcctctccc	tgctccccg t					1341

<210> 449

<211> 648

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável sintética de Li81

<400> 449

gatatccaga	tgacccagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gagtgttagc	agctacttag	cctggtacca	acagaaacct	120
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcatccaaca	gggccactgg	catcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	240
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggccgatgta	cacttttggc	300
caggggacca	agctggagat	caaacgtacg	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	360
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaact	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	420
tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaag	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	480
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcaccctg	540
acgtgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	cacccatcag	600
ggcctgagct	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgttag		648

<210> 450

<211> 1341

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesda variável aglicosilada sintética Li81

<400> 450

qaagtacaat	tqttagagtc	tgggtggcgg	cttqttcagc	ctqgtqgttc	tttacgtctt	60
tcttcgcgtg	cttccggatt	cactttctct	gcttacgaga	tgaagtgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttctgtt	atcggtcctt	ctggtggctt	tactttttat	180
gctgactccg	ttaaaggtcg	cttactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	aacagagggg	300
gataatgatg	cttttgatat	ctggggccaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	aagcgcctcc	360
accaagggcc	catcggctct	ccccctggca	ccctcctcca	agagcacctc	tgggggcaca	420
gcggccctgg	gctgcctggg	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggt	gtcgtggaac	480
tcaggcgccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttccccgctg	tcctacagtc	ctcaggactc	540
tactccctca	gcagcgtggg	gaccgtgccc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	600
tgcaacgtga	atcacaagcc	cagcaacacc	aaggtggaca	agaaagttga	gccccaaatct	660
tgtgacaaga	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	720
gtcttcctct	tcccccaaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccggac	ccctgaggtc	780
acatgcgtgg	tgggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	840
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcgcg	900
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	960
aagtgcaagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcgc	agaaaaccat	ctccaaagcc	1020
aaagggcagc	cccagagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	1080
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	1140
gagtgaggaga	gcaatgggca	gccggagaa	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgttggtg	1200
tccgacggct	ccttcttctc	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	1260
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	1320

agcctctccc tgtctcccg t

1341

<210> 451

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve variável de kappa 6 de subgrupo murino sintética

<400> 451

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

<210> 452

<211> 96

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável de HVMS de subgrupo murino sintética

<400> 452

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

85	90	95
<210>	453	
<211>	96	
<212>	PRT	
<213>	Sequência artificial	
<220>		
<223>	Sequência de consenso murina sintética	
<220>		
<221>	CARACTERÍSTICA_MISTA	
<222>	(2)..(2)	
<223>	Xaa ou é isoleucina ou valina	
<220>		
<221>	CARACTERÍSTICA_MISTA	
<222>	(54)..(54)	
<223>	Xaa ou é aspartato ou glutamato	
<220>		
<221>	CARACTERÍSTICA_MISTA	
<222>	(61)..(61)	
<223>	Xaa ou é treonina ou alanina	
<220>		
<221>	CARACTERÍSTICA_MISTA	
<222>	(62)..(62)	
<223>	Xaa ou é glutamato ou aspartato	
<220>		
<221>	CARACTERÍSTICA_MISTA	
<222>	(65)..(65)	
<223>	Xaa is either glutamina ou lisina	
<220>		
<221>	CARACTERÍSTICA_MISTA	
<222>	(79)..(79)	
<223>	Xaa ou é valina ou alanina	
<220>		
<221>	CARACTERÍSTICA_MISTA	
<222>	(83)..(83)	
<223>	Xaa ou é fenilalanina ou isoleucina	
<400>	453	

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

<210> 454
<211> 96
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Linhagem germinar de VGK6 murina

<400> 454
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

<210> 455
<211> 94
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de cadeia leve variável capa 3 de subgrupo humano sintética

<400> 455
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

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

<210> 456

<211> 95

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de consensosintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa pode ser ou glutamina ou glutamato

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISTA

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa pode ser ou isoleucina ou treonina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (11) .. (11)

<223> Xaa pode ser ou metionina ou leucina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (13) .. (13)

<223> Xaa pode ser ou alanina ou leucina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (18) .. (18)

<223> Xaa pode ser ou lisina ou arginina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa pode ser ou valina ou alanina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa pode ser ou metionina ou leucina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (22) .. (22)
 <223> Xaa pode ser ou treonina ou serina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (24) . . (24)
 <223> Xaa pode ser ou serina ou arginina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISTA
 <222> (27) .. (27)
 <223> Xaa pode ser ou serina ou glutamina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (31) . . (31)
 <223> Xaa pode ser ou serina ou não presente

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa pode ser ou metionina ou leucina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (34) . . (34)
 <223> Xaa pode ser ou histidina ou alanina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa pode ser ou serina ou prolina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (42)..(42)
 <223> Xaa pode ser ou treonina ou glutamina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa pode ser ou serina ou alanina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa pode ser ou lisina ou arginina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISTA
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa pode ser ou arginina ou leucina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (47) . . (47)
 <223> Xaa pode ser ou triptofan ou leucina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (51) .. (51)
 <223> Xaa pode ser ou treonina ou alanina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (53) . . (53)
 <223> Xaa pode ser ou lisina ou asparaGlna

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (54) . . (54)
 <223> Xaa pode ser ou leucina ou arginina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (56) .. (56)
 <223> Xaa pode ser ou serina ou treonina
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (58) .. (58)

<223> Xaa pode ser ou valina ou isoleucina
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (70) . . (70)
 <223> Xaa pode ser ou serina ou aspartato

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (71) . . (71)
 <223> Xaa pode ser ou tirosina ou fenilalanina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (72) . . (72)
 <223> Xaa pode ser ou serina ou treonina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa pode ser ou metionina ou leucina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (80)..(80)
 <223> Xaa pode ser ou alanina ou prolina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa pode ser ou alanina ou fenilalanina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (85)..(85)
 <223> Xaa pode ser ou treonina ou valina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (91) . . (91)
 <223> Xaa pode ser ou triptofan ou arginina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (93).. (93)
 <223> Xaa pode ser ou serina ou asparaGlna

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISTA
 <222> (94)..(94)
 <223> Xaa pode ser ou asparaGlna ou triptofan

<400> 456
 Xaa Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Xaa Xaa Ser Xaa Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Cys Xaa Ala Ser Xaa Ser Val Ser Xaa Tyr
 20 25 30
 Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Xaa Gly Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Xaa Ser Xaa Xaa Ala Xaa Gly Xaa Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Xaa Xaa Leu Thr Ile Ser Ser Xaa Glu Xaa
 65 70 75 80
 Glu Asp Xaa Ala Xaa Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Ser Xaa Xaa Pro
 85 90 95

<210> 457
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Linhagem germinal de L6 humana

<400> 457
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

<210> 458
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada variável de MHV1 de subgrupo humano sintética

<400> 458

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

<210> 459

<211> 98

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de consenso sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISTA

<222> (9) . . (9)

<223> Xaa pode ser ou prolina ou histidina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (11) . . (11)

<223> Xaa pode ser ou leucina ou valina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (13)..(13)

<223> Xaa pode ser ou lisina ou glutamina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (16)..(16)

<223> Xaa pode ser ou glutamato ou alanina
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa pode ser ou treonina ou serina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa pode ser ou isoleucina ou valina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa pode ser ou treonina ou serina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa pode ser ou arginina ou treonina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa pode ser ou lisina ou prolina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa pode ser ou lisina ou glutamina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa pode ser ou lisina ou glutamato

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (51)..(51)
 <223> Xaa pode ser ou isoleucina ou fenilalanina

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (54) .. (54)
 <223> Xaa pode ser ou aspartato ou tirosina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (57) . . (57)
<223> Xaa pode ser ou glutamato ou arginina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (61) .. (61)
<223> Xaa pode ser ou treonina ou alanina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (62).. (62)
<223> Xaa pode ser ou glutamato ou glutamina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISTA
<222> (63) .. (63)
<223> Xaa pode ser ou aspartatoou glicina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (65)..(65)
<223> Xaa pode ser ou glutaminaou treonina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (69)..(69)
<223> Xaa pode ser ou alanina ou valina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (72) . . (72)
<223> Xaa pode ser ou leucina ou metionina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (73)..(73)
<223> Xaa pode ser ou glutamatoou aspartato

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISTA
<222> (79)..(79)
<223> Xaa pode ser ou valina ou alanina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (83) . . (83)
 <223> Xaa pode ser ou fenilalanina ou isoleucina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (84) . . (84)
 <223> Xaa pode ser ou arginina ou serina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISTA
 <222> (85) .. (85)
 <223> Xaa pode ser ou arginina ou serina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (88) .. (88)
 <223> Xaa pode ser ou arginina ou alanina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (91) .. (91)
 <223> Xaa pode ser ou treonina ou metionina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (93) .. (93)
 <223> Xaa pode ser ou treonina ou metionina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (95) .. (95)
 <223> Xaa pode ser ou fenilalanina ou tirosina

<400> 459
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Xaa Glu Xaa Lys Xaa Pro Gly Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Xaa Gly Leu Xaa Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Xaa Asn Thr Xaa Thr Gly Xaa Pro Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Phe
 50 55 60
 Xaa Gly Arg Phe Xaa Phe Ser Xaa Xaa Thr Ser Ala Ser Thr Xaa Tyr

65		70		75		80									
Leu	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Lys	Xaa	Glu	Asp	Xaa	Ala	Xaa	Tyr	Xaa	Cys
85		90		95											

Ala Arg

<210> 460
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Linhagem germinal de huVH7-81 humana

<400> 460

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

Ala Arg

<210> 461
 <211> 1395
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia pesada de H2 de huPlA7-IgG1 humana

<400> 461

atggactgga	cctggaggggt	cttctgcttg	ctggctgtag	caccaggtgc	ccactcccag	60
gtccaactgg	tacagtctgg	acacgaggtg	aagcagcctg	gagcatcagt	caaggtctcc	120
tgcaaggcct	ctgggtatac	cttcacaaac	tatggaatga	actgggtgaa	gcaggctcct	180
ggacaagggt	taaagtggat	gggctggata	aacaccgaca	ctggagagcc	aacatatatact	240
oaaqatttcc	aqqgacgggt	tgtcttctct	ttggacacct	ctgccagcac	tqttttatttg	300
cagatcagca	gcctcaaagc	taggacatggcaatgtatt	actgtgcaag	agaggggggtc		360
cactttgact	actggggcca	agggacccttgctcacctgtct	cctcagcctc	caccaagggc		420

ccatcggtct	tccccctggc	accctcctccaagagcacct	ctgggggcac	agcggccctg	480
gggtgcctgg	tcaaggacta	cttccccgaaccggtgacgg	tgtcgtggaa	ctcaggcgcc	540
ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttcccggtgtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	600
agcagcgtgg	tgaccgtgcc	ctccagcagcttgggcaccc	agacctacat	ctgcaacgtg	660
aatcacaagc	ccagcaacac	caaggtggacaagaaagttg	agcccaaatc	ttgtgacaag	720
actcacacat	gcccaccgtg	cccagcacctgaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcctc	780
ttcccccaaa	aaccaagga	caccctcatgatctcccgga	cccctgaggt	cacatgcgtg	840
gtggtggacg	tgagccacga	agaccctgaggtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	900
gaggtgcata	atgccaagac	aaagccgcgggaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	960
gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggactggtgaatg	gcaaggagta	caagtgcaag	1020
gtctccaaca	aagccctccc	agcccccatcgagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	1080
ccccgagaac	cacaggtgta	caccctgcccccatcccgga	atgagctgac	caagaaccag	1140
gtcagcctga	cctgcctggt	caaaggttctatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	1200
agcaatgggc	agccggagaa	caactacaagaccacgcctc	ccgtgttgga	ctccgacggc	1260
tcctttcttc	tctacagcaa	gctcaccgtggacaagagca	ggtggcagca	ggggaacgtc	1320
ttctcatgct	ccgtgatgca	tgaggctctgcacaaccact	acacgcagaa	gagcctctcc	1380
ctgtctcccg	gttga				1395

<210> 462

<211> 464

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada de H2 de huPlA7-IgG1 humana

<400> 462

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu	Ala Val Ala Pro Gly
1	5 10 15
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Gln	
20	25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
35	40 45
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50	55 60
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr	
65	70 75 80
Glu Asp Phe Gln Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser	
85	90 95
Thr Val Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Met Ala Met	
100	105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Val His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
115	120 125
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe	
130	135 140
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu	

145	150	155	160
Gly Cys Leu Val Lys Asp	Tyr Phe Pro Glu	Pro Val Thr Val Ser Trp	
165	170	175	
Asn Ser Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val Leu	
180	185	190	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser	Val Val Thr Val Pro Ser	
195	200	205	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln	Thr Tyr Ile Cys Asn	Val Asn His Lys Pro	
210	215	220	
Ser Asn Thr Lys Val Asp	Lys Lys Val Glu	Pro Lys Ser Cys Asp Lys	
225	230	235	240
Thr His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu Gly Gly Pro	
245	250	255	
Ser Val Phe Leu Phe Pro	Pro Lys Pro Lys Asp	Thr Leu Met Ile Ser	
260	265	270	
Arg Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val Asp	Val Ser His Glu Asp	
275	280	285	
Pro Glu Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu Val His Asn	
290	295	300	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr Asn	Ser Thr Tyr Arg Val	
305	310	315	320
Val Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu	
325	330	335	
Tyr Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Glu Lys	
340	345	350	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr Thr	
355	360	365	
Leu Pro Pro Ser Arg Asp	Glu Leu Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu Thr	
370	375	380	
Cys Leu Val Lys Gly Phe	Tyr Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu Trp Glu	
385	390	395	400
Ser Asn Gly Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val Leu	
405	410	415	
Asp Ser Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys	
420	425	430	
Ser Arg Trp Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His Glu	
435	440	445	
Ala Leu His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly	
450	455	460	

<210> 463

<211> 708

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve de L1 capa de huPlA7 humana

<400> 463

```
atggattttc aggttcagattttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatatcc 60
agaggagaaa ttgttctcaccagctctcca gcaaccttgt ctttatctcc aggggagaga 120
gccaccttgt cctgcagtgccagctcaagt gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag 180
ccaggccaag cgcccagaagactgatttat gacacatcca aactggcttc tggaatccct 240
gctcqtctca gtgqcaqtgggtctctggqacc qattacactc tceccatcag cagcttggag 300
cctgaagatt tcgccgttta ttactgccag cagtggagta gtaaccatt caggttcggc 360
caggggacaa aggtggaaat aaaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600
acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 708
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag
```

<210> 464

<211> 235

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve de LI de huPlA7 humana

<400> 464

```
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Ile Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr
20 25 30
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro
65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175
```

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 465
 <211> 708
 <212> ADN

<220>
 <223> Sequência de cadeia leve de L2 capa de huPlA7 humana

<400> 465
 atggattttc aggttcagattttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatatcc 60
 agaggacaaa ttgttctcaccagtcctcca gcaaccttgt ctttatctcc aggggagaga 120
 gccaccttgt cctgcagtgccagctcaagt gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag 180
 ccaggccaag cgcccagaagactgatttat gacacatcca aactggcttc tggaatccct 240
 gctcgcttca gtggcagtggtctgggacc gattacactc tcaccatcag cagcttgag 300
 cctgaagatt tcgccgtttattactgccag cagtggagta gtaacccatt cacgttcggc 360
 caggggacaa aggtggaaataaaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccatctgatg agcagttgaaatctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagtacagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
 caggagagtg tcacagagcaggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600
 acgctgagca aagcagactacgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660
 ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 708

<210> 466
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia leve de L2 de huPlA7 humana

<400> 466
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr
 20 25 30

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110
 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 467

<211> 708

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve de capa de chPLA7 quimérico murino e Humana

<400> 467

atggattttc	aggtgcagat	tttcagcttc	ctgctaataca	gtgcctcagt	cataatatcc	60
agaggacaaa	ttgttctcac	ccagtctcca	gcaatcatgt	ctgcatctcc	aggggagaag	120
gtcaccatga	cctgcagtgc	cagctcaagt	gtaagttaca	tgcactggta	ccagcagaag	180
tcaggcacct	cccccaaaag	atggatttat	gacacatcca	aactggcttc	tggagtcctc	240
gctcgcttca	gtggcagtgg	gtctgggacc	tcttactctc	tcacaatcag	cagcatggag	300
gctgaagatg	ctgccactta	ttactgccag	cagtggagta	gtaaccatt	cacgttcggc	360
tcggggacaa	agttggaaat	aaaacgtacg	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	420
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaact	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	480
tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaag	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	540
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcacccctg	600

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 708

<210> 468

<211> 235

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia leve de chPlA7 quimérico murino e humana

<400> 468

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu lie Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala lie
20 25 30
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
50 55 60
Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr lie
85 90 95
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys
115 120 125
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 469
 <211> 1395
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada de chPlA7 quimerico murino e humano

<400> 469

atggactgga	cctggagggt	cttctgcttg	ctggctgtag	caccaggtgc	ccactcccag	60
gtccaactgg	tacagtctgg	acctgagctg	aagaagcctg	gagagacagt	caagatctcc	120
tgcaaggcct	ctgggtatac	cttcacaaac	tatggaatga	actgggtgaa	gcaggctcca	180
ggaaagggtt	taaagtggat	gggctggata	aacaccgaca	ctggagagcc	aacatatact	240
gaagatttcc	agggacggtt	tgccttctct	ttggaaacct	ctgccagcac	tgtttatttg	300
cagttcaaca	acctcaaaaa	tgaggacacg	gctacatatt	tctgtgcaag	agaggggggtc	360
cactttgact	actggggcca	agggaccacg	gtcaccgtct	cctcagcctc	caccaagggc	420
ccatcggtct	tccccctggc	accctcctcc	aagagcacct	ctggggggcac	agcggccctg	480
ggctgcctgg	tcaaggacta	cttccccgaa	ccggtgacgg	tgtcgtggaa	ctcaggcgcc	540
ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttccccggt	gtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	600
agcagcgtgg	tgaccgtgcc	ctccagcagc	ttgggcaccc	agacctacat	ctgcaacgtg	660
aatcacaagc	ccagcaacac	caaggtggac	aagaaagttg	agcccaaate	ttgtgacaag	720
actcacacat	gcccaccgtg	cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcctc	780
ttccccccaa	aacccaagga	caccctcatg	atctcccgga	cccctgaggt	cacatgcgtg	840
gtggtggacg	tgagccacga	agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	900
gaggtgcata	atgccaaagc	aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	960
gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcaag	1020
gtctccaaca	aagccctccc	agcccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	1080
ccccgagaac	cacaggtgta	caccctgccc	ccatcccggg	atgagctgac	caagaaccag	1140
gtcagcctga	cctgcctggt	caaaggcttc	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	1200
agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	ccgtgttgga	ctccgacggc	1260
tccttcttcc	tctacagcaa	gtcaccgtg	gacaagagca	ggtggcagca	ggggaacgtc	1320
ttctcatgct	ccgtgatgca	tgaggctctg	cacaaccact	acacgcagaa	gagcctctcc	1380
ctgtctcccg	gttga					1395

<210> 470

<211> 464

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de cadeia pesada de chPlA7 quimérico murino e humana

<400> 470

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Val	Phe	Cys	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Gly
1						5			10					15	
Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys
20						25			30						

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gln Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Val Tyr Leu Gln Phe Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly Val His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
405					410					415					
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
420					425					430					
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
435					440					445					
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
450					455					460					

<210> 471
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de cadeia leve sintética 3

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

<210> 472
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de cadeia pesada sintética 1

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	His	Glu	Val	Lys	Gln	Pro	Gly	Ala
1					5					10					15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
20					25					30					

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

<210> 473
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Variante de cadeia pesada sintética 3

<400> 473
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Phe Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Met Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Val His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 474
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Sequência de cadeia pesda variável aglicosilada sintética de Lf81

<400> 474

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
1 5 10 15
Ala His Ser Glu Val Gin Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gin
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Ala Tyr Glu Met Lys Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Pro Ser Gly Gly Phe Thr Phe Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95
Thr Leu Tyr Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Gly Asp Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
115 120 125
Gin Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gin Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Ala Tyr
305 310 315 320
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gin Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gin Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gin Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gin Gin Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly
 465

Lisboa, 3 de Junho de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antigénio que se pode ligar especificamente a um polipéptido de Sp35, em que o anticorpo ou o seu fragmento compreende:

uma região VH que compreende as sequências VH CDR1, CDR2 e CDR3 da SEQ ID NO: 436, SEQ ID NO: 437, e SEQ ID NO: 438 respectivamente, e

a região VL que compreende as sequências VL CDR1 CDR2 e CDR3 da SEQ ID NO: 442, SEQ ID NO: 443 e SEQ ID NO: 444 respectivamente

em que o anticorpo dos seus fragmentos liga a um polipéptido com uma afinidade caracterizada por uma constante diassociação não superior a 5×10^{-10} M como medido usando FACS em células CHO estavelmente transfectadas com Sp35 humano.

2. O anticorpo ou seu fragmento da reivindicação 1, em que o anticorpo compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 434 e a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 433.

3. O anticorpo ou seu fragmento da reivindicação 1, em que o anticorpo compreende a forma madura da sequência de aminoácido definida na SEQ ID NO: 474 e, opcionalmente, a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 434

4. O anticorpo ou seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3, que é um antagonista da morte celular neuronal mediada por Sp35.

5. O anticorpo ou seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3, que é um antagonista de inibição de mielinização mediada por Sp35.

6. O anticorpo ou seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3, que é um antagonista da inibição da diferenciação de oligodendrócitos mediada por Sp35.

7. Utilização do anticorpo Sp35 isolado ou seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3 na preparação de um medicamento para o tratamento de uma lesão CNS num animal.

8. Utilização de anticorpos Sp35 isolados ou seus fragmentos de qualquer uma das reivindicações 1-3 na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença seleccionada de entre o grupo que consiste em: esclerose múltipla (MS), a leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), a encefalomielite (EPL), a mielose pôntica central (CPM), a adrenoleucodistrofia, a doença de Alexander, a doença de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), leucodistrofia de células Globóides (doença de Krabbe), a degeneração Wallerina, a neurite óptica, a mielite transversal, a esclerose lateral amiotrófica (ELA), a doença de Huntington, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, lesões da medula espinal, lesão traumática do cérebro, lesão pós-radiação, complicações neurológicas da quimioterapia, acidente vascular cerebral, neuropatia óptica isquémica aguda, deficiência de vitamina E, síndrome da deficiência de vitamina E isolada, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia trigeminal e paralisia de Bell num animal.

9. A utilização da reivindicação 8, em que a doença ou distúrbio é a esclerose múltipla.

10. O anticorpo Sp35 isolado ou seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3, para uso no tratamento de uma lesão do CNS num animal.

11. O anticorpo Sp35 isolado ou seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3, para uso no tratamento de uma doença seleccionada a partir do grupo que consiste em: esclerose múltipla (MS), a leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), a encefalomielite (EPL), a mielose pôntica central (CPM), a adrenoleucodistrofia, a doença de Alexander, a doença de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), leucodistrofia de células Globóides (doença de Krabbe), a degeneração Wallerina, a neurite óptica, a mielite transversal, a esclerose lateral amiotrófica (ELA), a doença de Huntington, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, lesões da medula espinal, lesão traumática do cérebro, lesão pós-radiação, complicações neurológicas da quimioterapia, acidente vascular cerebral, neuropatia óptica isquémica aguda, deficiência de vitamina E, síndrome da deficiência de vitamina E isolada, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia trigeminal e paralisia de Bell num animal.

12. O anticorpo Sp35 isolado ou um seu fragmento, da reivindicação 11, em que a doença ou distúrbio é a esclerose múltipla.

13. Um método *in vitro* de inibição da transdução de sinal por NgR1, compreendendo o contacto com NgR1 com uma

quantidade eficaz do anticorpo Sp35 isolado ou seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3.

14 . Uma célula hospedeira que compreende;

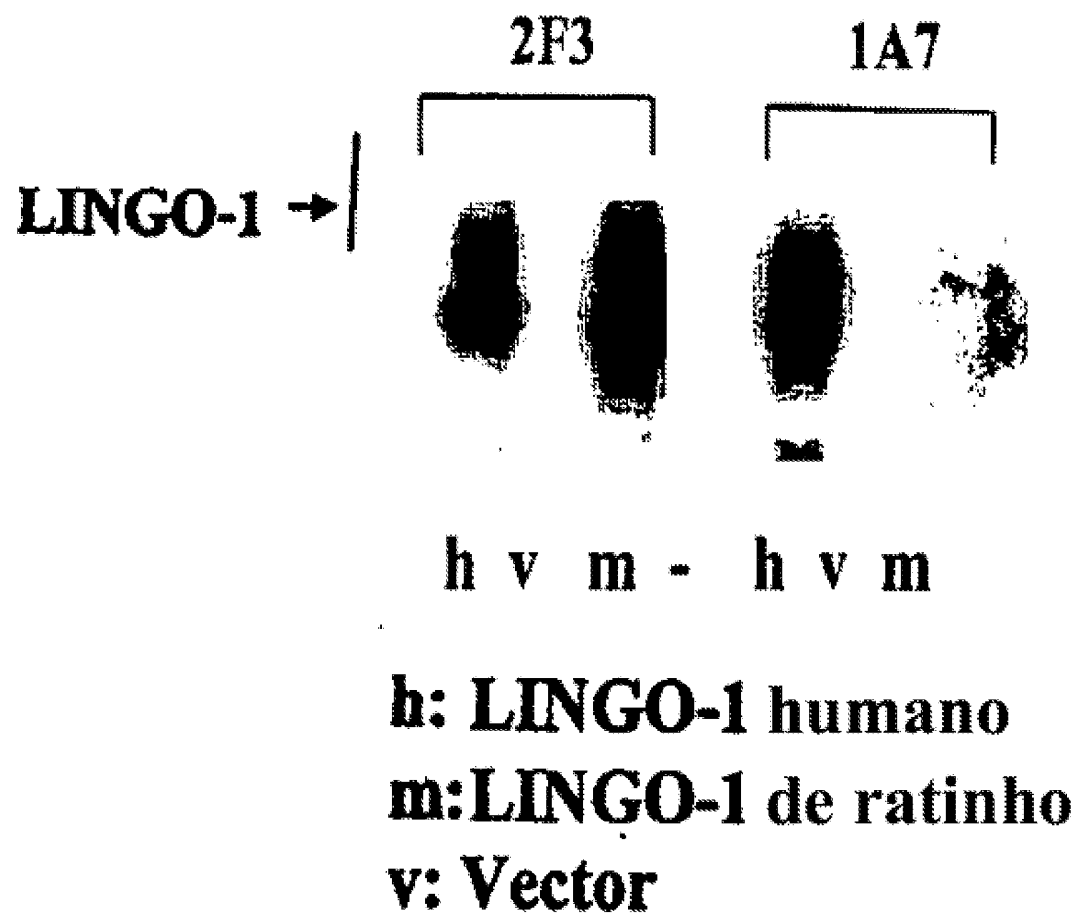
(a) dois vectores de expressão,

em que o primeiro vector de expressão codifica a região VH do anticorpo ou fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3 e o segundo vector de expressão codifica a região VL do anticorpo ou fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3, ou

(b) um único vector de expressão que codifica tanto a região VH do anticorpo ou fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3 ou a região VL do anticorpo ou fragmento de qualquer uma das reivindicações 1-3.

Lisboa, 3 de Junho de 2014

FIG. 1



Dados de FACS de células 293 transfeccionadas de LINGO-1 humano

1A7

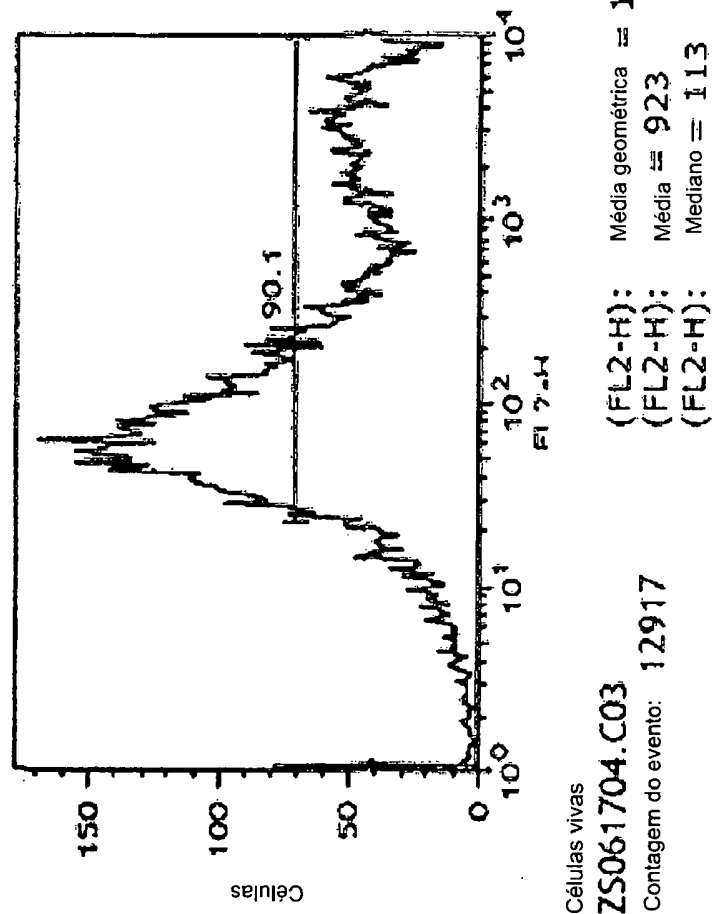


Fig 2A

Dados de FACS de células 293 transfeccionadas de LINGO-1 humano
2F3

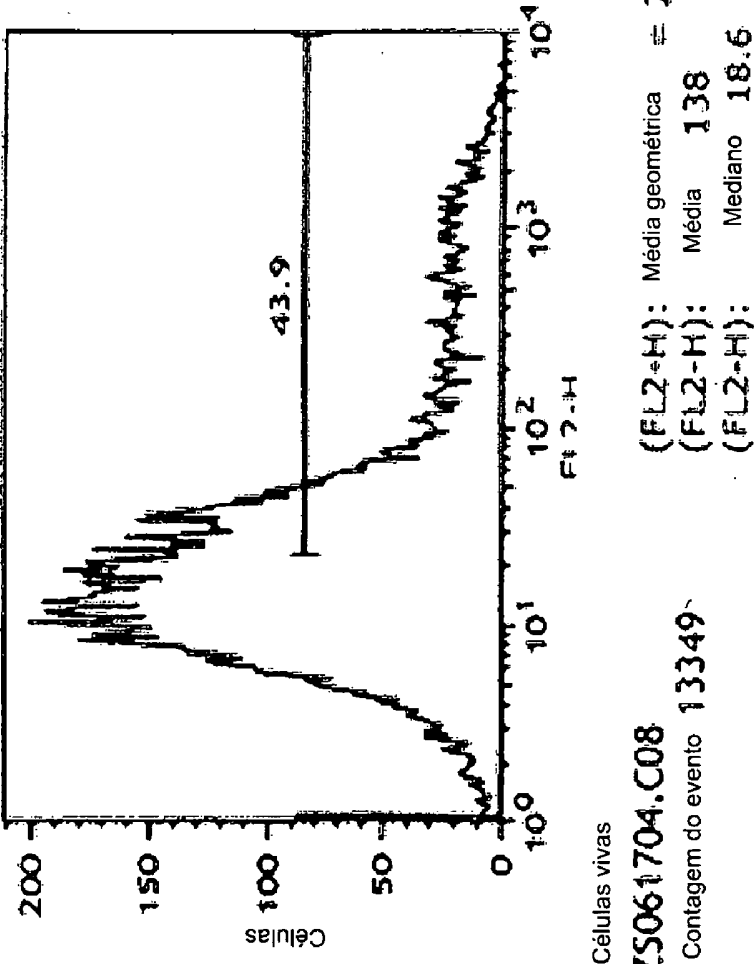


Fig 2B

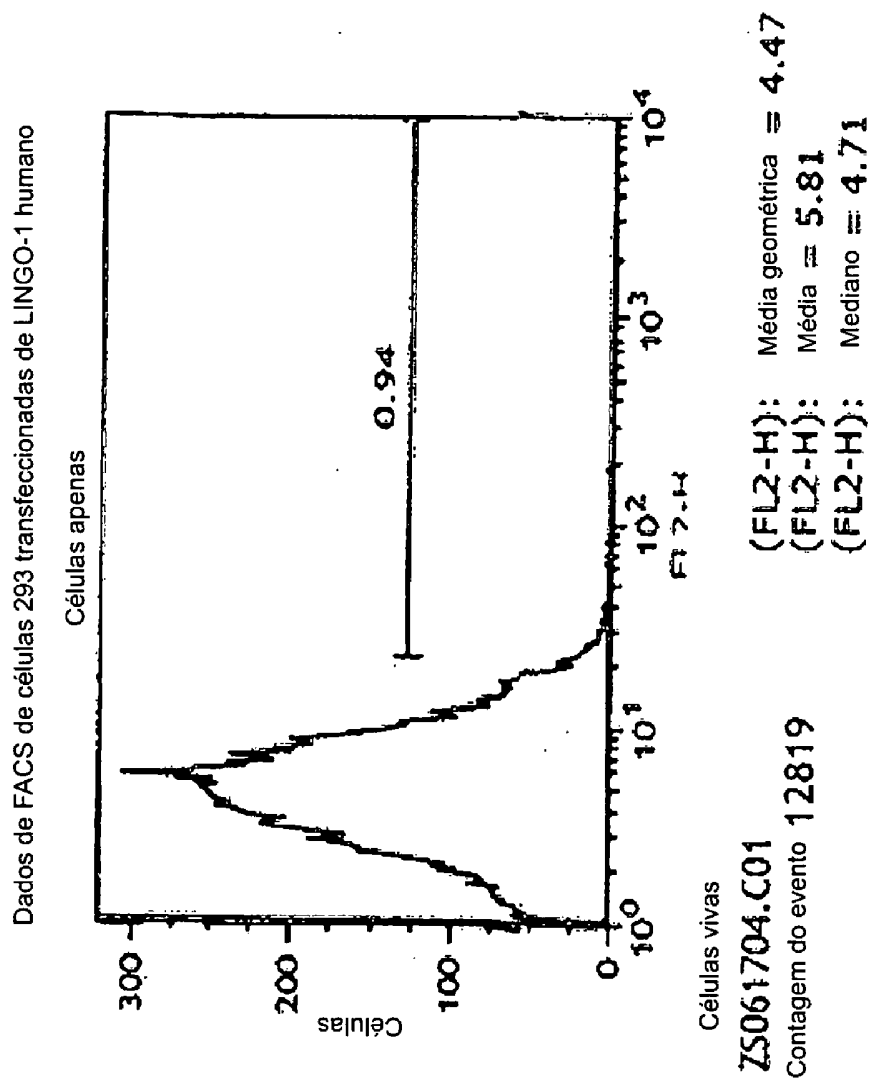


Fig 2C

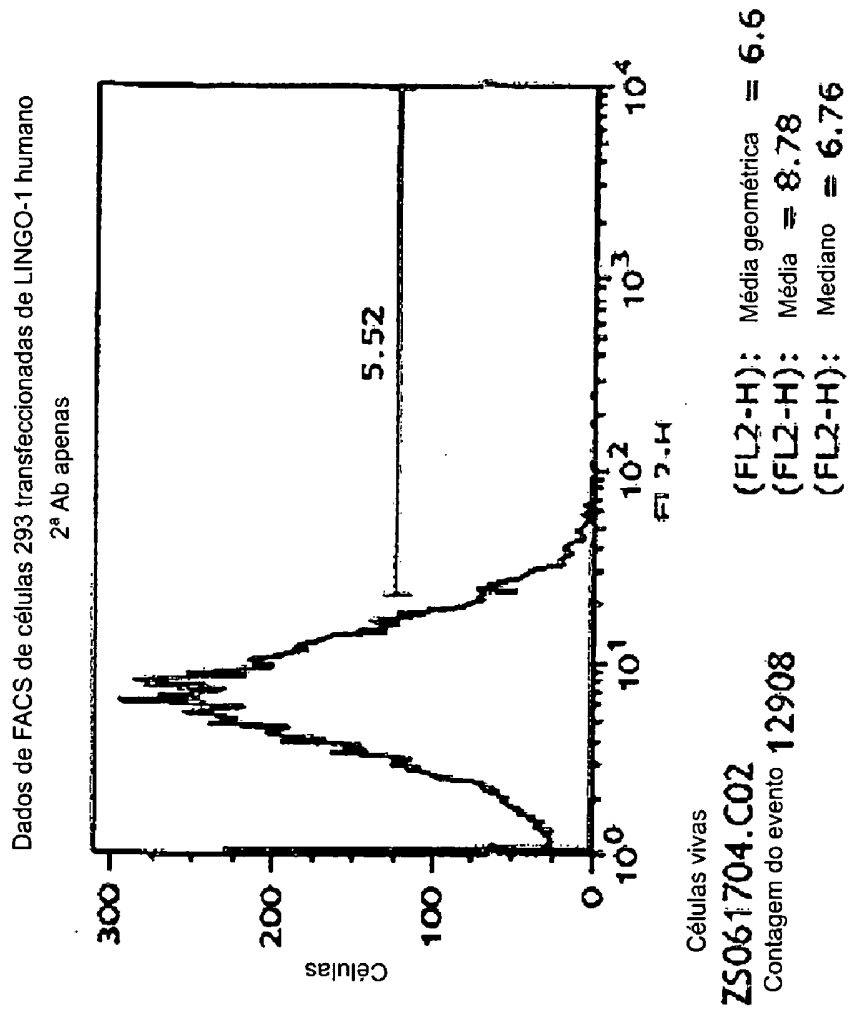


Fig 2D

1A7 e 2F3 promovem desenvolvimento de neurite de CGN e DRG

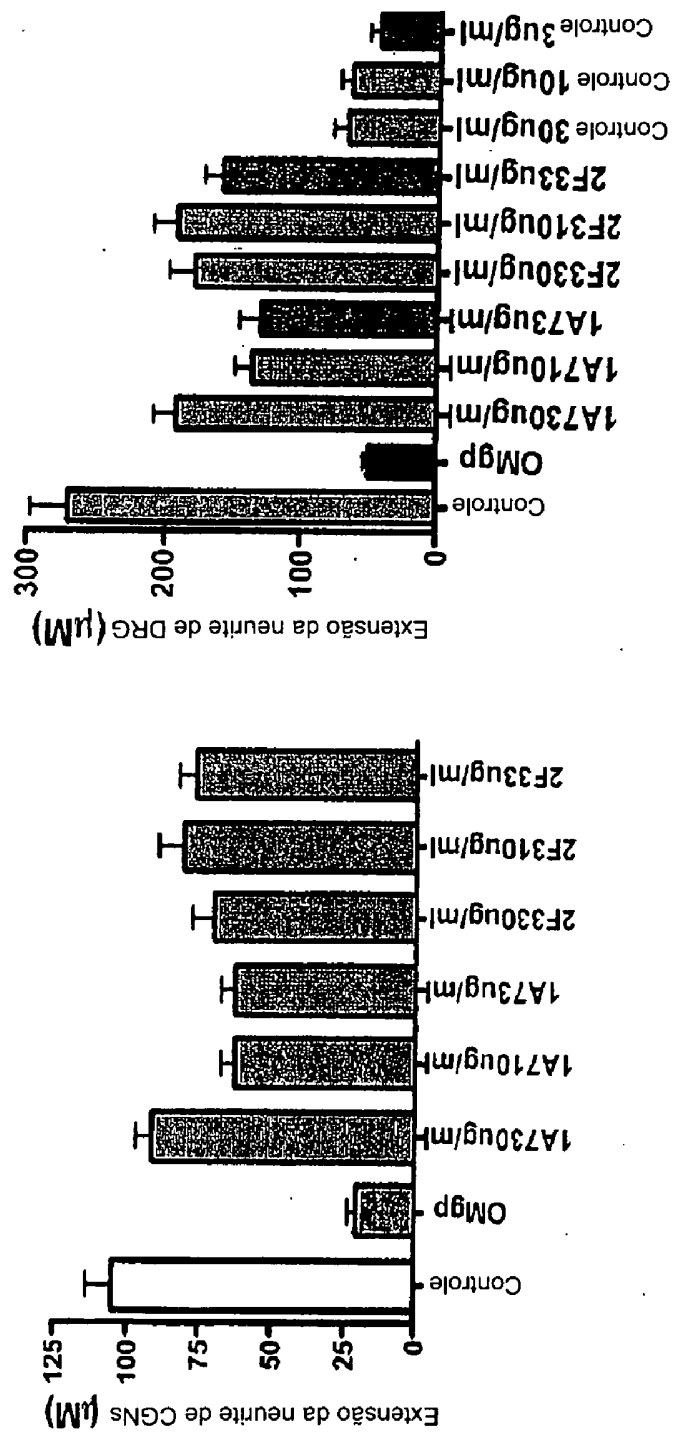


Fig 3

**Fig. 4: mAbs anti-LINGO-1 Promovem a Mielinação
em Co-cultura**

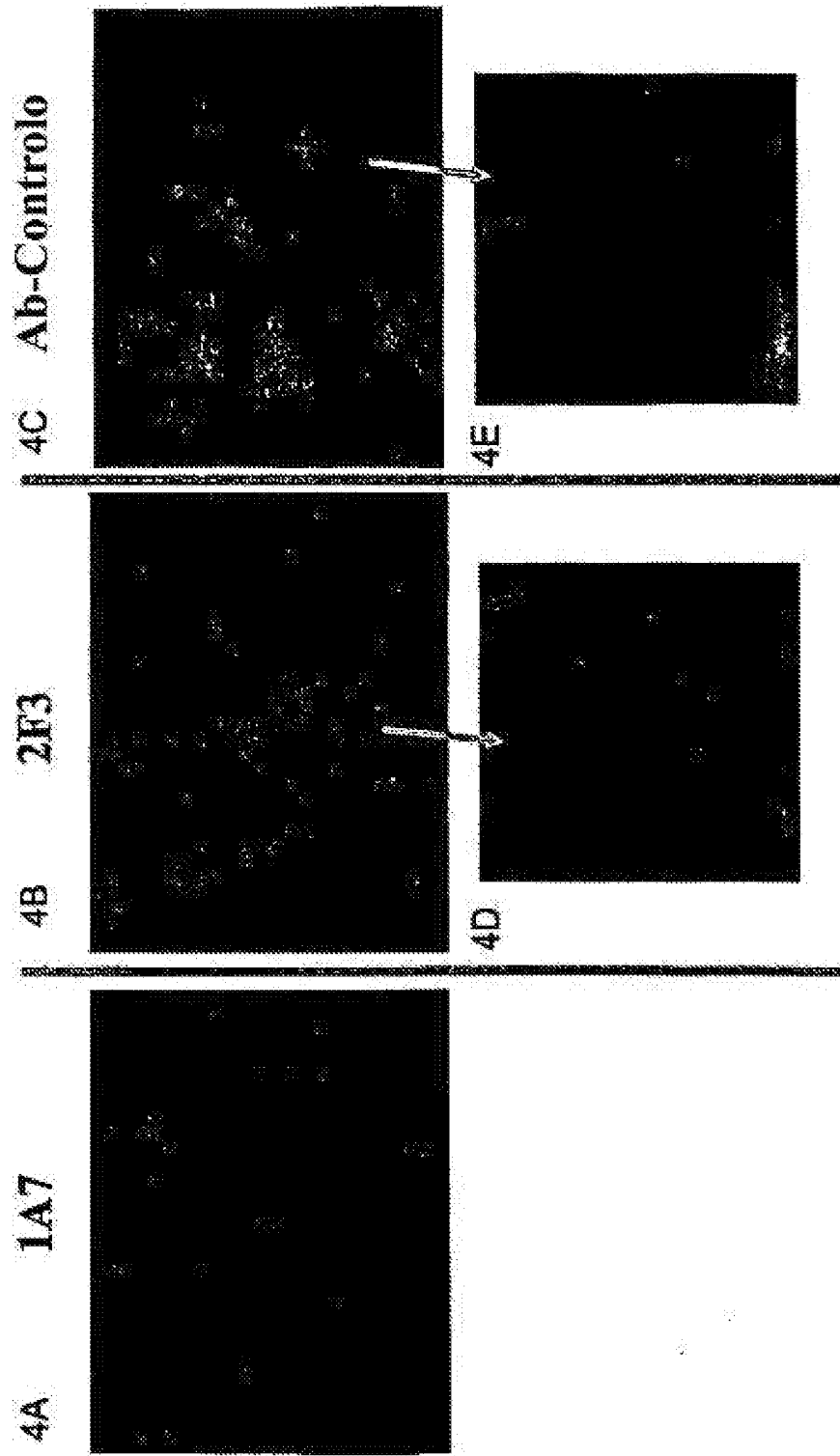


**Fig. 4: Anticorpos anti-LINGO-1 Promovem
Mileinação em Cu-cultura**

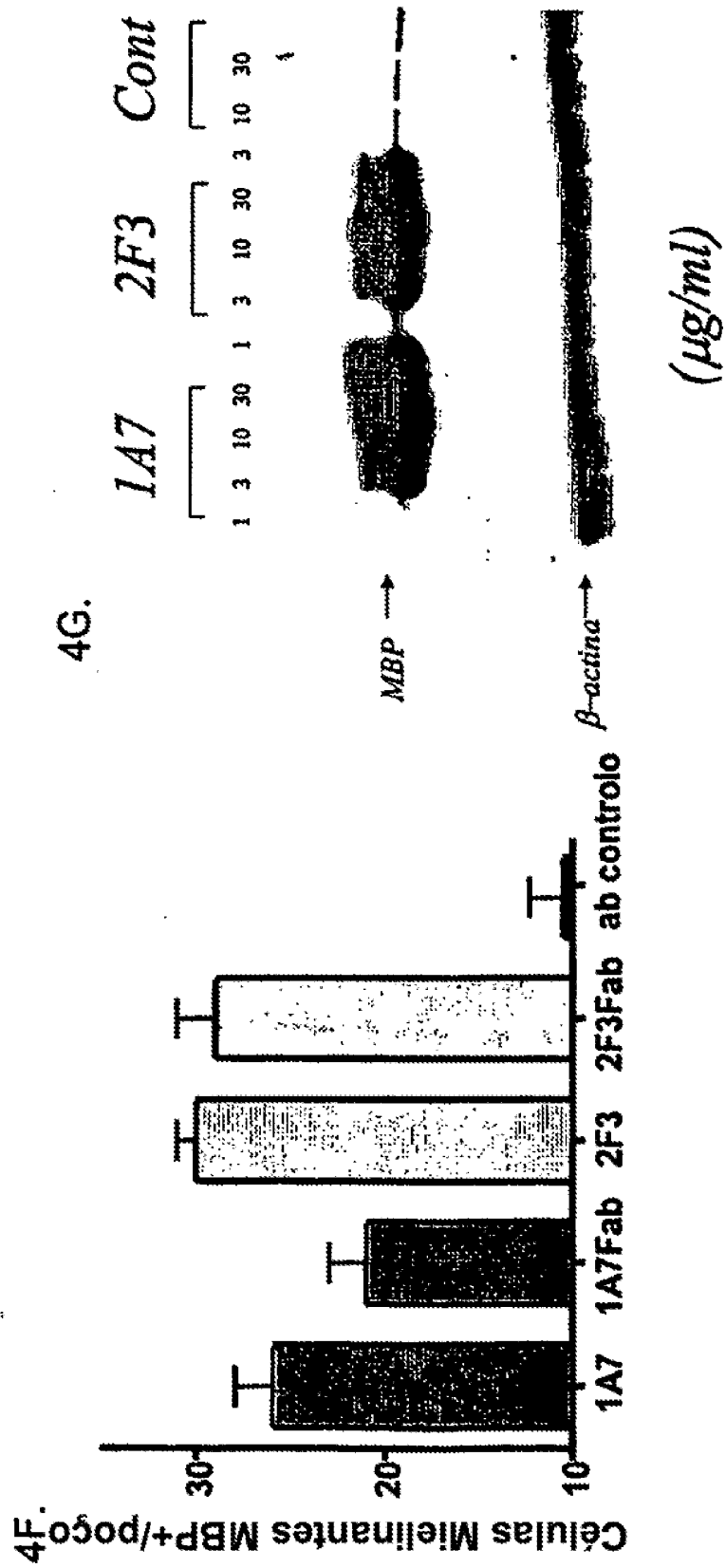
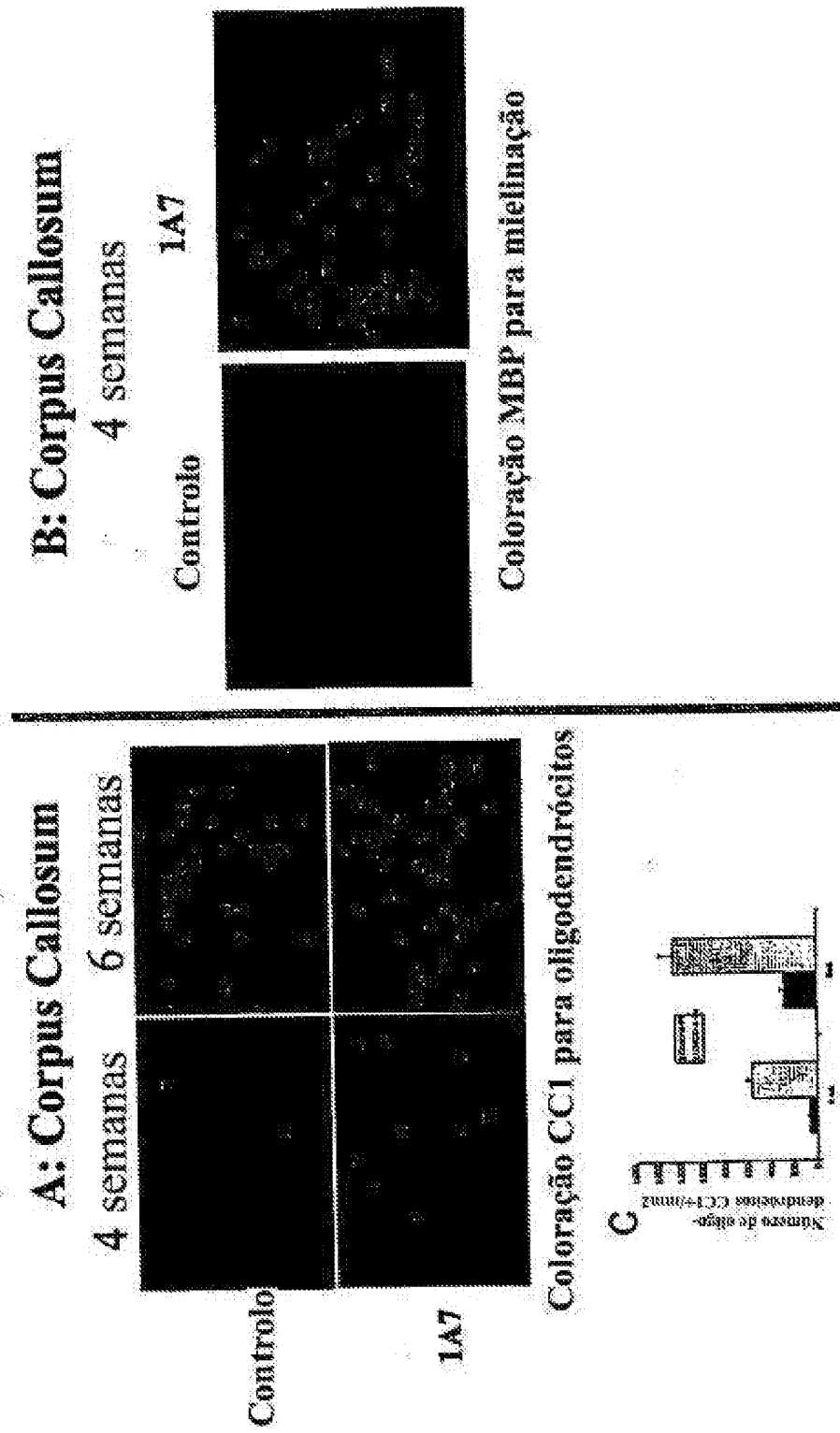


Fig. 5: 1A7 Promove a Remileinação e Sobrevivência de Oligodendrócitos no Modelo da Cuprizona



1A7 Promove a Sobrevivência dos Neurónios de RGC

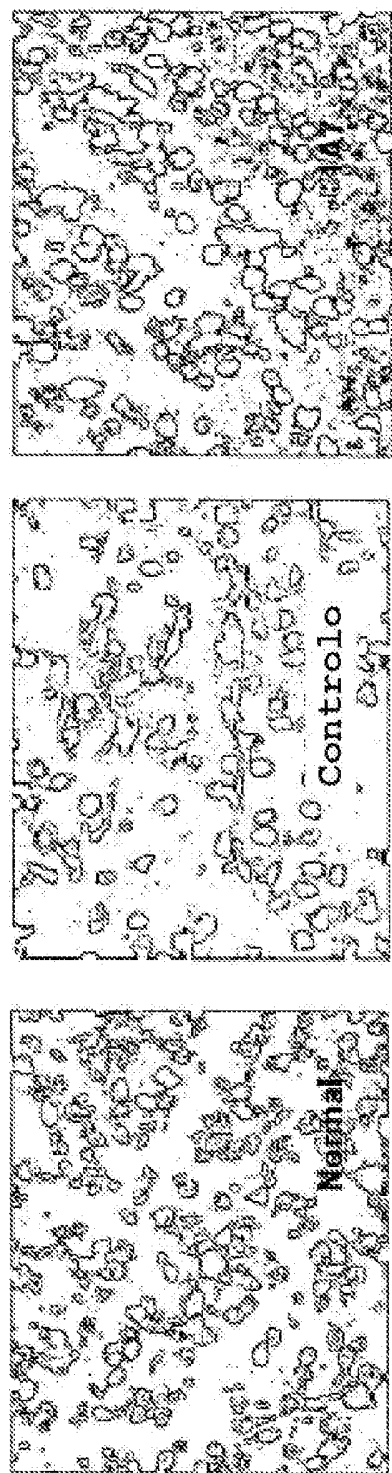


Fig 6

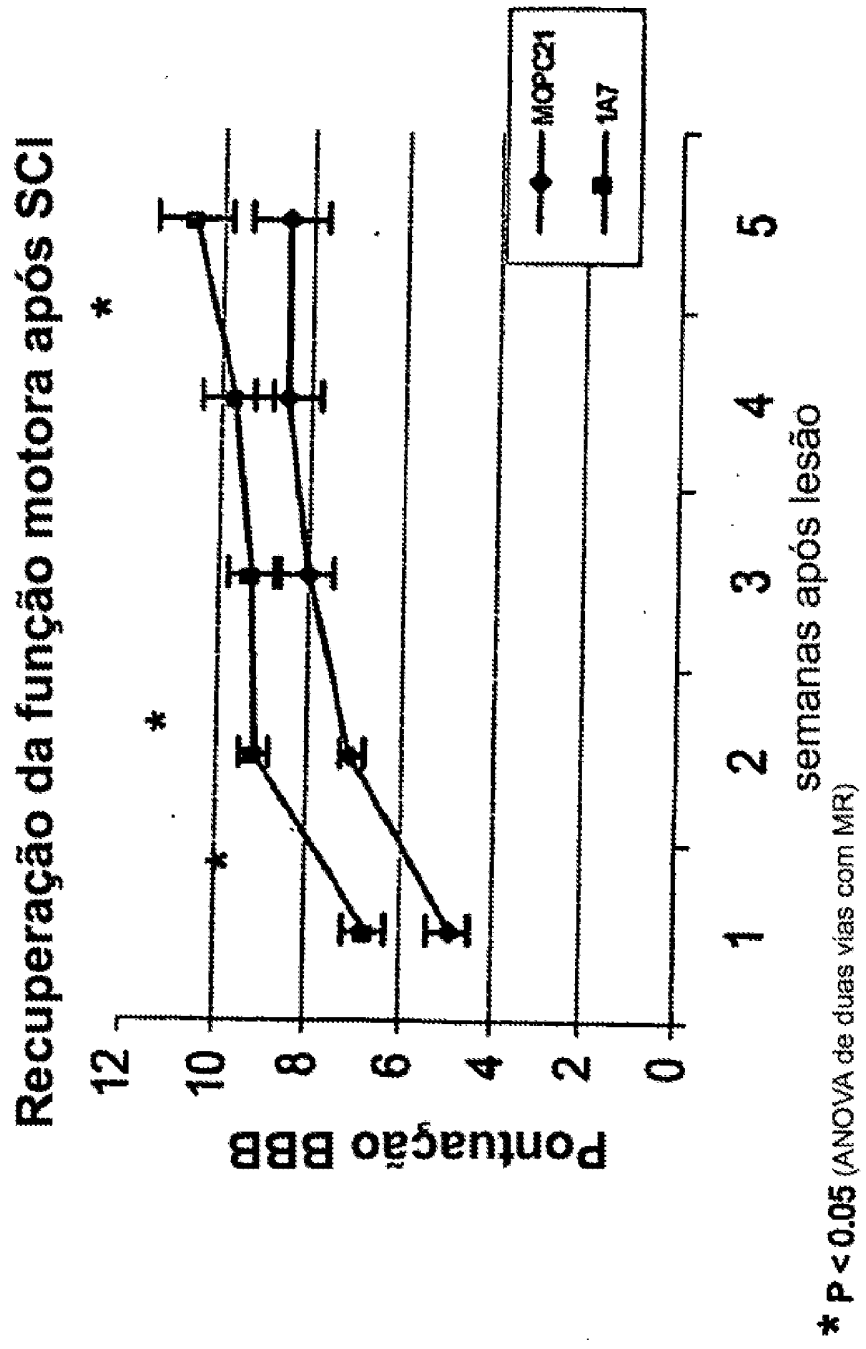


Fig 7

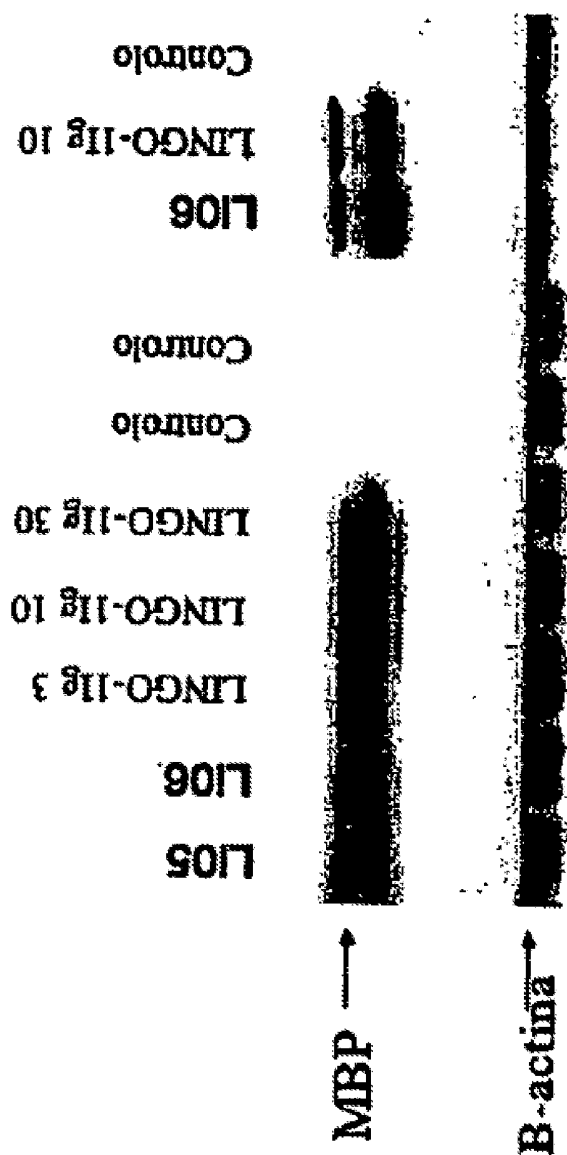


Fig 8

O Tratamento com 1A7 Promove a re-mielinação e a Reparação no Modelo de Neurite Óptica do Rato

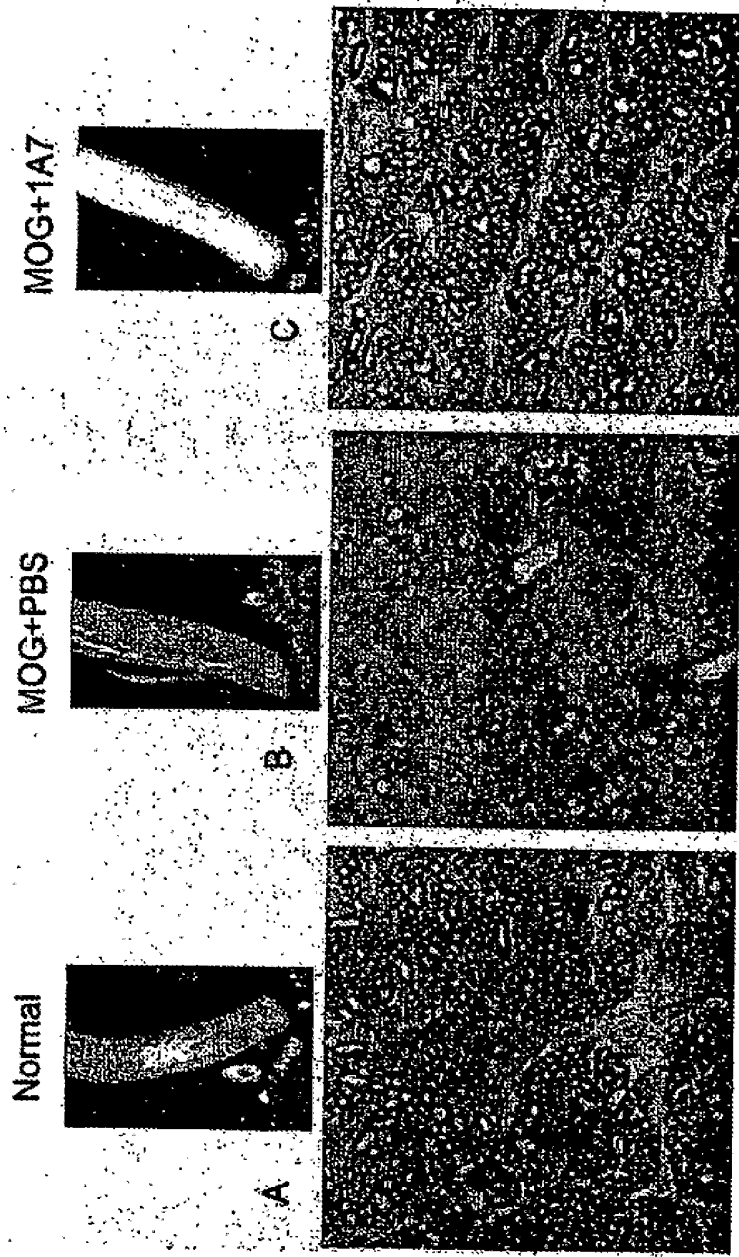


FIG. 9

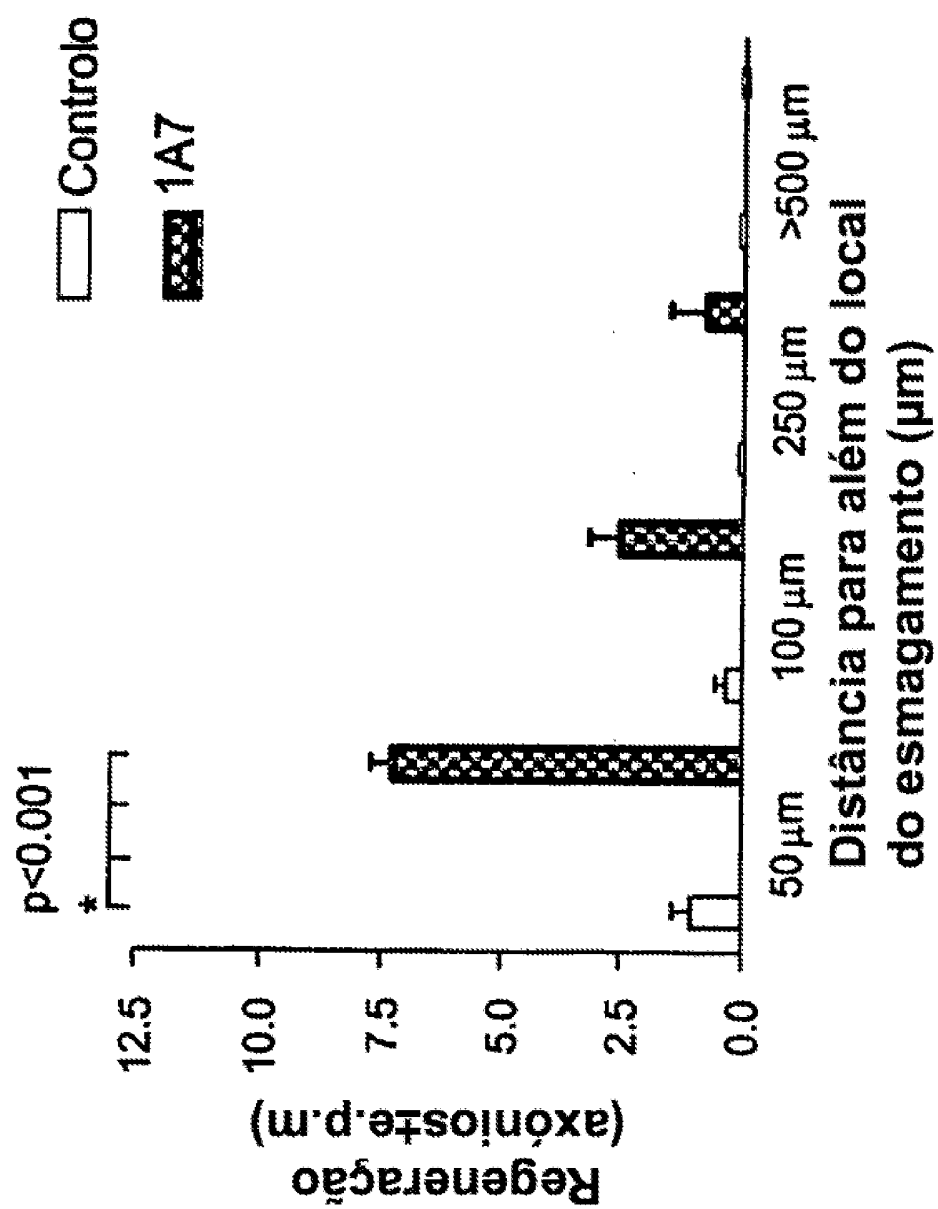


Fig. 10

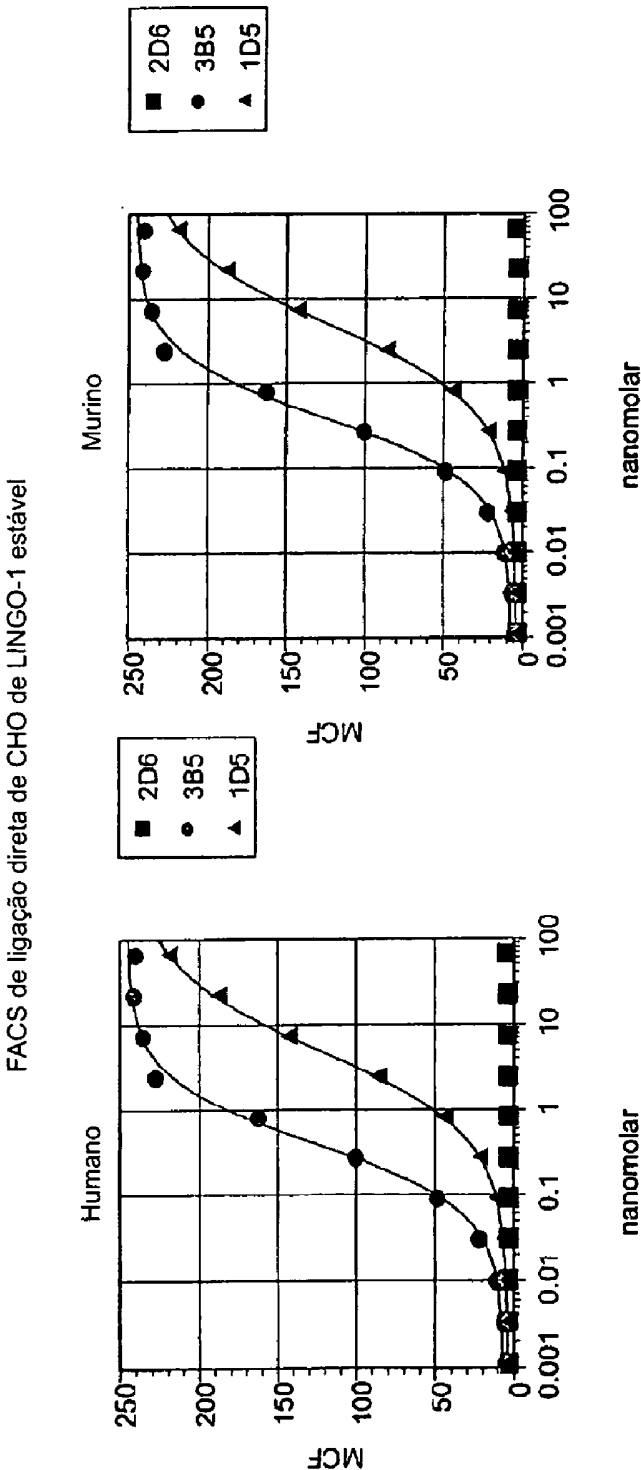


Fig. 11

RESUMO

ANTICORPOS sp35 E SUAS UTILIZAÇÕES

Endógeno Sp35 é um regulador negativo para a sobrevivência neuronal, a regeneração do axônio, a diferenciação de oligodendrócitos e mielinização. As moléculas que bloqueiam a função de Sp35 endógena, tais anticorpos anti-Sp35 podem ser utilizados como agentes terapêuticos para o tratamento de disfunção de oligodendrócitos e neurónios. A presente invenção proporciona anticorpos específicos para Sp35, e métodos para a utilização desses anticorpos como antagonistas da função do endógeno Sp35. O invento proporciona ainda anticorpos específicos de hibridoma e de fagos derivada de biblioteca monoclonais, ácidos nucleicos que codificam esses anticorpos, e vectores e células hospedeiras que compreendem estes anticorpos. O invento proporciona ainda métodos de promover a sobrevivência de oligodendrócitos e mielinização num vertebrado, compreendendo a administração a um vertebrado em necessidade de tal tratamento de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-Sp35.